

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Evaluación de un nuevo sustituto óseo basado en biovidrios
mesoporosos suplementados con zinc, osteostatina y
células mesenquimales para el tratamiento de defectos
críticos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Beatriz Bravo Giménez

DIRECTORES

Luis Rafael Ramos Pascua
Antonio Jesús Salinas Sánchez

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



TESIS DOCTORAL

**Evaluación de un nuevo sustituto óseo basado en biovidrios
mesoporosos suplementados con zinc, osteostatina y células
mesenquimales para el tratamiento de defectos críticos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

Presentada por **Beatriz Bravo Giménez**

Directores

Luis Rafael Ramos Pascua

Antonio Jesús Salinas Sánchez

Madrid, 2020

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



TESIS DOCTORAL

**Evaluación de un nuevo sustituto óseo basado en biovidrios
mesoporosos suplementados con zinc, osteostatina y células
mesenquimales para el tratamiento de defectos críticos**

Bajo la dirección de:

Luis Rafael Ramos Pascua

Antonio Jesús Salinas Sánchez

Madrid, 2020

A mis padres, mi marido Javier, mi familia

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría darles las gracias a mis directores de tesis. Al Doctor Ramos por sus ánimos y su buena disposición siempre para escuchar cualquier duda, preocupación o imprevisto cada vez que llamaba a la puerta de su despacho o enviaba un correo electrónico a horas intempestivas. Al Doctor Salinas, por guiarme y ayudarme en este largo camino y por enseñarme tantas cosas sobre la docencia y la investigación.

A Montserrat Grau y Gonzalo Luengo, sin los que habría sido imposible realizar toda la parte experimental. Por esas cirugías siempre con tan buena disposición y buen humor.

A Daniel Lozano, Sandra Sánchez-Salcedo y Clara Heras. Por compartir este proyecto conmigo desde el principio, ayudándome, enseñándome y mostrándome el valor y el día a día de un investigador. Daniel, gracias por tus análisis estadísticos con sus explicaciones siempre a tiempo. Por supuesto a Lorena Benito, porque sin ella y su análisis histológico hoy no podría presentar esta tesis. Gracias por tu impecable trabajo.

A los compañeros del laboratorio de imagen del hospital Gregorio Marañón; por tantas reuniones y correos contestados con una paciencia infinita. Principalmente a Mónica Abella y Patricia Moreno por su magnífico trabajo.

Al proyecto P115/00978: “Soportes biocerámicos enriquecidos con células mesenquimales y osteostatina para la regeneración de defectos óseos”, financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), el Instituto Carlos III y el Ministerio de Sanidad y Consumo.

A mis padres porque lo que soy se lo debo a ellos. Por enseñarme lo que significa el esfuerzo. Por mostrarme que, en la vida, es tan importante la actitud como los conocimientos. Por sus consejos, por ser como son y por su apoyo incondicional.

A Javier, mi marido. Por estar ahí siempre, por darme ánimos, por hacerme reír sin descanso, por darme tantas buenas ideas y por alegrarme cada minuto de mis días en este largo camino.

Gracias

Abreviaturas

- ASC: Células mesenquimales derivadas de tejido adiposo
- BMD: Densidad mineral ósea
- BMP: Proteína morfogenética ósea
- BVF: Volumen de hueso en el volumen total
- B+C: Muestras con biocerámica y células mesenquimales
- B+C+O: Muestras con biocerámica, células mesenquimales y osteostatina
- B+O: Muestras con biocerámica y osteostatina
- CMM: Célula madre mesenquimal
- CSF-M: Factor estimulador de macrófagos
- CT.Th: Grosor cortical
- DCM: Diclorometano
- DCP: Fosfato dicálcico
- DMB: Matriz ósea desmineralizada
- EGF: Factor de crecimiento epidérmico
- EISA: Autoensamblaje inducido por evaporación
- FA: Fosfatasa alcalina
- FDA: Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos
- FGF: Factor de crecimiento fibroblástico
- FWHM: Anchura del perfil a la mitad del máximo
- GA: Glutaraldehído
- HA: Hidroxiapatita
- IGF: Factor de crecimiento de insulina
- IL-6: Interleuquina 6
- LDH: Lactato deshidrogenasa
- Micro-CT: Micro escáner

- MOH: Médula ósea hematopoyética
- MSC: Células mesenquimales pluripotenciales
- MSCBM: Células madre mesenquimales humanas en medio basal
- OMS: Organización mundial de la salud
- OPG: Osteoprotegerina
- OP-1: Proteína morfogenética 7 (BMP-7)
- PBS: Solución de fosfato salino
- PDGF: Factor de crecimiento plaquetario
- PKA: Proteinkinasa
- PMMA: Polimetilmetacrilato
- PRP: Plasma rico en plaquetas
- PTH: Hormona paratiroidea
- PTHR1: Receptor tipo 1 de la paratohormona
- PTHrp: Péptido derivado de la paratohormona
- PTHrp fracción 107-111: Osteostatina
- PVC: Policloruro de vinilo
- RANK: Receptor activador del factor nuclear κ B
- RANK-L: Ligando de RANK
- RIA: Reamer irrigation aspiration
- RGD: Secuencia de aminoácidos (Arginina-Glycina-Aspártico)
- RMN: Resonancia Magnética Nuclear
- ROI: Región de interés
- RUNX-2: Factor de transcripción para la diferenciación osteoblastos
- RX: Radiografía
- SBF: Fluido corporal simulado (Kokubo)
- SEM: Microscopía electrónica de barrido
- SPSS: Statistical package for the social sciences

- TAC: Tomografía axial computarizada
- Tb.Sep: Separación trabecular
- Tb.N: Número trabecular
- Tb.Th: Grosor trabecular
- TCP: Fosfato tricálcico
- TGF: Factor transformador del crecimiento
- TGF β : Factor de crecimiento transformante tipo β
- TNF: Factor de necrosis tumoral
- VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular
- VM: Vidrio mesoporoso
- Zn^{2+} : Zinc

Índice

1. Resumen	13
1.1 Resumen español	13
1.2 Resumen inglés	19
2. Introducción	24
2.1 Biología ósea	24
2.1.1 Introducción	24
2.1.2 Composición del hueso	24
2.1.3 Modelado y remodelado óseo	28
2.2 Defectos óseos	29
2.2.1 Definición y tipos de defectos	29
2.2.2 Defectos óseos críticos	30
2.2.3 Consolidación de los defectos óseos	30
2.3 Estrategias de reparación de los defectos óseos	32
2.3.1 Regeneración ósea guiada	32
2.3.2 Osteodistracción	33
2.3.3 Injertos óseos	33
2.3.4 Biomateriales	35
2.4 Ingeniería de tejidos	37
2.4.1 Matrices	37

	Índice
2.4.2 Células	39
2.4.3 Señales	41
BMP y PGDF	42
Osteostatina	43
2.5 Elección del tema y estado actual	45
3. Hipótesis de trabajo y objetivos	47
4. Material y métodos	48
4.1 Síntesis y caracterización del material	48
4.2 Elección del modelo animal	53
4.3 Elección del defecto óseo crítico	55
4.4 Instalaciones sala experimental	57
4.5 Protocolo anestésico	60
4.6 Protocolo quirúrgico	62
4.7 Grupos experimentales	68
4.8 Análisis histológico	68
4.9 Análisis de imagen	70
4.10 Análisis estadístico	78
5. Resultados	79
5.1 Resultados macroscópicos	79
5.2 Resultados histológicos	85
5.2.1 Análisis detallado de las muestras	85

	Índice
5.2.2 Resumen de resultados histológicos	106
5.3 Resultados análisis de imagen	107
5.3.1 Análisis detallado de las muestras	107
5.3.2 Resumen de resultados de análisis de imagen	125
5.4 Análisis estadístico	126
5.4.1 Análisis detallado por tiempos y grupos de estudio	127
5.4.2 Resumen de resultados estadísticos	134
6. Discusión	135
7. Conclusiones	142
8. Bibliografía	143
9. Difusión científica de la tesis	156
10. Anexo de resultados	157

1. RESUMEN

1.1 Resumen (español)

La regeneración ósea es un proceso continuo en el que la actividad osteoclástica (destructora) y la osteoblástica (formadora) se suceden de forma coordinada. El objetivo es que el hueso mejore su forma y arquitectura para cumplir con sus funciones como soporte mecánico. Un hueso debidamente remodelado sustituirá al original. Pero hay situaciones en las que la capacidad de reparación ósea se ve superada y se requiere una cantidad de regeneración tal que excede el propio potencial del tejido óseo. Estas situaciones se dan en los grandes defectos de huesos largos provocados por traumatismos de alta energía, por resecciones tumorales amplias, infecciones, aflojamientos protésicos o por el tratamiento de determinadas deformidades esqueléticas.

En este campo y en los últimos años nuestro grupo de investigación ha desarrollado los vidrios mesoporosos bioactivos, biocerámicas más avanzadas que hemos elegido para nuestro proyecto por dos características diferenciales; generar la respuesta in vitro más rápida descrita por un biomaterial y presentar un alto volumen de poros para albergar moléculas osteogénicas. Simultáneamente a través de un equipo conjunto de investigación, se ha demostrado el gran potencial osteoinductor de la osteostatina (PTHrp₁₀₇₋₁₁₁) cuando se añade sobre una biocerámica, con ventajas sobre las BMPs. Si a ello le sumamos la acción de las células mesenquimales considerábamos fundamental el crear y probar en un modelo animal un nuevo biomaterial que incluyera tanto el vidrio mesoporoso como la osteostatina y las células, con el objetivo de sentar las bases en el desarrollo de un equivalente tisular que pueda llegar a utilizarse en clínica humana.

Objetivo

Analizar la reparación ósea de un defecto crítico de conejo a nivel radiocubital a través de un análisis histológico y de imagen, tras implantar un equivalente óseo fabricado a partir del vidrio mesoporoso bioactivo 76%SiO₂-15%CaO-5%P₂O₅-4%ZnO enriquecido con osteostatina y/o células mesenquimales.

Material y métodos

Material

Se han fabricado soportes biocerámicos a partir de vidrios mesoporosos bioactivos que presentan alto volumen de macroporos y canales. Estos soportes $76\% \text{SiO}_2$ - $15\% \text{CaO}$ - $5\% \text{P}_2\text{O}_5$ - $4\% \text{ZnO}$, una vez fabricados se han recubierto por inmersión en gelatina al 2,4% (peso/volumen), polímero endurecedor biocompatible, con baja antigenicidad y alta bioabsorción in vivo. Como último paso y según el grupo de estudio, se han sembrado con células madre mesenquimales obtenidas de médula ósea humana y/o cargado con osteostatina por impregnación 24 horas antes de su implantación.

Diseño experimental

31 conejos hembras adultas ex-reproductoras de aproximadamente 4-5 kg de peso (± 500 g), de raza “Conejo gigante de Nueva Zelanda” y más de 18 semanas, fueron intervenidas mediante la realización de un defecto crítico en el cúbito de una de sus patas delanteras. El defecto se creó mediante osteotomía diafisaria con una sierra oscilante y sustracción de 15 milímetros tras medición directa y cumpliendo con las máximas condiciones de esterilidad. Posteriormente, el defecto se rellenaba con el material asignado. La elección de la pata derecha o izquierda se realizó de forma aleatoria.

Para la cirugía se empleó sedación preanestésica con dosis intramusculares de xylazina (25 mg/kg), ketamina (4 mg/kg) y atropina (1 mg/kg). En el inicio de la cirugía, mantuvimos la ketamina con dosis de 1-1.5 mg, añadiendo halotano al 3-4% de mantenimiento con mascarilla. Las intervenciones se llevaron a cabo bajo profilaxis antibiótica mediante cefazolina de 50 mg/kg, en dos dosis. La primera dosis se administró tras la inducción anestésica y la segunda transcurridas 12 horas. Para el tratamiento del dolor se empleó meloxicam 5 mg/ml y en el sacrificio utilizamos el método de la sobredosis anestésica con equipromacina y tiopental.

Se crearon tres grupos experimentales:

- Grupo B+O: biocerámica y osteostatina.
- Grupo B+C: biocerámica y células.
- Grupo B+C+O: biocerámica, células y osteostatina.

Cada uno de los grupos contaba al menos con nueve conejos inicialmente y dos tiempos de seguimiento, seis y doce semanas. Y cada uno de los tiempos tenía asignado un control con biocerámica sin señales ni células añadidas.

Análisis

Para determinar los efectos de nuestro biomaterial, los especímenes se sacrificaron a las 6 y 12 semanas. Las muestras fueron analizadas mediante tres tipos de análisis:

- **Análisis macroscópico**

Se registraron los datos quirúrgicos, incidencias y el aspecto macroscópico del defecto tras la implantación del material correspondiente.

- **Análisis histológico**

Tras la toma de muestras óseas una vez sacrificados los animales de experimentación, éstas fueron conservadas en etanol de 96° para su fijación y conservación. Al tratarse de muestras óseas no descalcificadas, fueron lavadas con agua y serradas para delimitar macroscópicamente las zonas de lesión. Posteriormente, las piezas fueron deshidratadas mediante inmersión en soluciones de etanol de gradación creciente.

Los protocolos de tinción empleados fueron Tricrómico de Goldner y Von Kossa, que permiten distinguir el osteoide del hueso calcificado, así como la morfología y distribución de las células en el tejido.

Las imágenes microscópicas de las muestras histológicas se captaron utilizando una máquina fotográfica Nikon digital Sight DS-smc acoplada a un microscopio óptico Nikon eclipse 90i.

- **Análisis de imagen**

Las muestras fueron analizadas con radiografía y escaneadas con el micro-TC de pequeño animal SuperArgus (Sedecal) analizándose las características del hueso neoformado mediante las siguientes variables:

- Volumen de hueso en el área a estudio: BV/TV.
- Parámetros trabeculares: grosor trabecular (Tb.Th); número trabecular (Tb.N); separación trabecular (Tb.Sep).
- Parámetros corticales en los bordes del defecto: Ct.Ar (área de hueso cortical/volumen cortical, mm²); Ct.Ar/Tt.Ar (fracción cortical, %); Ct.Th (media de grosor cortical, mm).

Estas variables se integraron en una interfaz, BoneAnalytics, desarrollada en MATLAB siguiendo un enfoque modular y basada en la programación orientada a objetos. Los datos medidos se guardaban automáticamente en una tabla de Excel individual para cada muestra.

- **Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se empleó el test no paramétrico de Kruskal Wallis para muestras independientes con el factor de corrección de Dunn para los valores de los parámetros óseos medidos en los tres grupos de estudio. Para la comparación dentro de cada grupo de dichos valores óseos con respecto al tiempo de seguimiento empleamos el test no paramétrico U de Mann Whitney. Valorábamos el efecto mediante la diferencia de medias y la precisión mediante el intervalo de confianza del 95%. En todos los casos, como grado de significación estadística se consideró un valor de $p < 0,05$.

Resultados

El número total de cerámicas implantadas fue de treinta y una. Once del grupo B+C, seis en el tiempo de seis semanas y cinco en el de doce. Nueve en el grupo B+O, con cinco con seguimiento de seis semanas y cuatro en el de doce semanas. Y nueve en el grupo B+C+O, con cuatro y cinco respectivamente.

Hubo seis pérdidas durante el seguimiento; ninguna de ellas en el postoperatorio inmediato.

Al analizar el aspecto macroscópico, observamos un buen resultado en 16 de las 23 piezas. En los casos de B+C+O y B+O, cuatro de cada grupo presentaban un relleno completo del defecto con buena consistencia. Esto ocurría de forma similar en dos de los casos de B+O. En otras seis piezas correspondientes a los tres grupos de estudio destaca un relleno completo, pero de consistencia fibrosa.

A nivel histológico, a las seis semanas y con relación a la respuesta ósea, hay más reacción del hueso adyacente a la cavidad del defecto en los casos del grupo B+O, encontrando procesos de formación ósea más activos, que presentan hueso regenerado. Teniendo en cuenta el factor de maduración del tejido conectivo desarrollado en la cavidad del defecto, el grupo B+C presenta una mayor maduración. A las doce semanas, el grupo que desarrolla más procesos de formación ósea sigue siendo el B+O. Además, presenta una respuesta homogénea, ya que en el grupo B+C+O hay grandes diferencias entre los casos, con hueso regenerado pero con disposición irregular de las trabéculas y zonas aún no totalmente mineralizadas. Con respecto a la presencia de restos de material, de forma generalizada en todos los grupos, éstos, o bien son pocos o están ausentes, lo que implica una degradación de material.

En el estudio de imagen, cómo era previsible, según avanza el tiempo los resultados encontrados fueron mejores en cuanto a la inducción de una mayor formación ósea. En el análisis estadístico, de los ocho resultados significativos, seis fueron en el grupo B+C+O, concluyendo que es este grupo el que induce una mayor regeneración ósea sobre todo a las 12 semanas, con un mayor BV/TV, Tb.Th, Tb.N y grosor cortical. Importante señalar, que este efecto positivo significativo se observa tanto en hueso trabecular como en hueso cortical.

Discusión

Nuestro presente estudio ha sido el primero en investigar en un defecto crítico de modelo animal los vidrios mesoporosos bioactivos, mejorados por añadir un ion osteogénico y bactericida como el zinc y un pentapéptido osteogénico y antirresortivo, la osteostatina, además de las células mesenquimales. Los resultados, en resumen, sugieren que los vidrios que contienen Zn^{2+} , células

madre mesenquimales y osteostatina mejoran significativamente la reparación en defectos críticos debido a la inducción de una mayor formación ósea a la vez que se produce la degradación de los implantes. Sin embargo, serán necesarios estudios in vivo que incorporen un número de controles mayor para permitir una comparación con una significación suficiente, cumpliendo con las normas de la ética animal, en animales superiores como ovejas o cerdos y con tiempos experimentales más prolongados, necesarios antes del uso clínico de estos materiales.

1.2 Resumen (inglés)

Bone regeneration is a continuous process in which osteoclastic (destroying) and osteoblastic (forming) activities occur in a coordinated way. The objective for the bone is to improve its shape and architecture to fulfill its functions as a mechanical support. A properly remodeled bone will replace the original. But there are situations in which the bone repair capacity is exceeded and require an amount of regeneration that exceeds the bone tissue's own potential. These situations occur in large bone defects caused by high-energy trauma, extensive tumor resections, infections, prosthetic loosening or by the treatment of certain skeletal deformities.

In this field, our research group has developed the most advanced bioactive mesoporous glasses, bioceramics that we have chosen for our project due to two differential characteristics; generate the fastest in vitro response described by a biomaterial and present a high volume of pores to house osteogenic molecules. Simultaneously, through a joint research team, they have demonstrated the great osteoinductive potential of osteostatin when added to a bioceramic, with advantages over BMPs. If we add the action of mesenchymal cells to this, we consider it essential to create and test a new biomaterial in an animal model that includes both glass and osteostatin and cells, with the aim of laying the foundations for the development of a tissue equivalent that can be used in humans.

Objective

Analyze the bone repair of a critical rabbit defect at the radio-ulnar synostosis through histological and image analysis, after implanting a bone equivalent made from the bioactive mesoporous glass 76%SiO₂-15%CaO-5%P₂O₅-4%ZnO enriched with osteostatin and / or mesenchymal cells.

Material and methods

Material

Bioceramic supports have been manufactured from bioactive mesoporous glasses that have high macropore volumes, useful for keeping osteogenic molecules. These supports, 76%SiO₂-

15%CaO-5%P₂O₅-4%ZnO, once manufactured, they have been coated by immersion in 2.4% gelatin (weight/volume), a biocompatible hardening polymer with low antigenicity and high in vivo bioabsorption. As a last step and according to the study group, they have been seeded with mesenchymal stem cells extracted from human bone marrow aspirate and / or loaded with osteostatin by impregnation 24 hours before their implantation.

Experimental design

Thirty one ex-breeding adult female rabbits weighing approximately 4-5 kg (+/- 500g) of the “New Zealand Giant Rabbit” breed and over eighteen weeks of age, were operated on by performing a critical defect in the ulna of its front legs. The defect was created by diaphyseal osteotomy with an oscillating saw and 15-millimeter subtraction after direct measurement and complying with the maximum sterile conditions. Subsequently, the defect was filled with the assigned material. The choice of the right or left leg was made randomly.

Pre-anesthetic sedation with intramuscular doses of xylazine (25 mg/kg), ketamine (4 mg/kg) and atropine (1 mg/kg) was used for surgery. At the beginning of the surgery, we maintained the ketamine with a dose of 1-1.5 mg, adding 3-4% halothane with mask maintenance. The interventions were carried out under antibiotic prophylaxis using cefazolin at a dose of 50 mg/kg, in two doses. The first was administered after anesthetic induction and the second after 12 hours. For pain treatment, 5 mg/ml meloxicam was used and in the sacrifice we used the method of anesthetic overdose with equipromazine and thiopental.

Three experimental groups were created:

- o Group B+O: bioceramics and osteostatin.
- o Group B+C: bioceramics and cells.
- o Group B+C+O: bioceramics, cells and osteostatin.

Each of the groups had at least nine rabbits initially and two follow-up times, 6 and 12 weeks.

Each of the times was assigned a control with bioceramics with no added signals or cells.

Analysis

To determine the effects of our biomaterial, the specimens were sacrificed at 6 and 12 weeks. The samples were analyzed by three type of analysis:

- Macroscopic analysis

Surgical data and macroscopic appearance of the defect were recorded after implantation of the material.

- Histological analysis

After taking bone samples once the experimental animals had been sacrificed, they were conserved in 96° ethanol for their fixation and conservation. As they were not decalcified bone samples, they were washed with water and serrated to macroscopically delimit the lesion areas. Subsequently, the pieces were dehydrated by immersion in ethanol solutions of increasing gradation.

The staining protocols used were Trichrome by Goldner and Von Kossa, which allow distinguishing the osteoid from the calcified bone, as well as the morphology and distribution of the cells in the tissue.

Microscopic images of the histological samples were captured using a Nikon digital Sight DS-smc photographic machine coupled to a Nikon eclipse 90i optical microscope.

- Imaging analysis

The samples were analyzed with radiography and scanned with the SuperArgus small animal micro-CT (Sedecal), analyzing the characteristics of the newly formed bone using the following variables:

- Volume of bone in the study area: BV / TV .
- Trabecular parameters: trabecular thickness (Tb.Th); trabecular number (Tb.N); trabecular separation (Tb.Sp).
- Cortical parameters at the edges of the defect: Ct.Ar (cortical bone area / cortical volume, mm^2); Ct.Ar/Tt.Ar (cortical fraction,%); Ct.Th (mean cortical thickness, mm).

These variables were integrated into a software, BoneAnalytics, developed in MATLAB following a modular approach and based on object-oriented programming. The measured data was automatically saved in an individual Excel table for each sample.

- **Statistic analysis**

For statistical analysis we used the SPSS. Statistical evaluation was carried out with the non-parametric Kruskal Wallis test for independent samples with Dunn's correction factor for the values of the bone parameters measured in the three study groups. For the comparison within each group of these bone values with respect to the follow-up time, we used the non-parametric Mann Whitney U test. We assessed the effect through the average difference and precision through the 95% confidence interval. In all cases, a value of $p < 0.05$ will be considered as a degree of statistical significance.

Results

The total number of ceramics implanted was thirty one. Eleven from group B+C, six in the six-week period and five in the twelve-week period. Nine in the B+O group, with five with a six-week follow-up and four in the twelve-week group. And nine in the B+C+O group, with four and five respectively.

There were six losses to follow up; none of them in the immediate postoperative period.

When analyzing the macroscopic appearance, we observed a good result in 16 of the 23 pieces. In the cases of B+C+O and B+O, four of each group presented a complete filling of the defect with good consistency. This happened in a similar way in two of the B+O cases. In six other pieces corresponding to the three study groups, a complete filling stands out, but with a fibrous consistency.

Histologically, at 6 weeks and in relation to the bone response, there is more reaction of the bone close to the defect cavity in the cases of group B+O, finding more active bone formation processes, which present regenerated bone. Taking into account the maturation factor of the connective tissue developed in the defect cavity, group B+C seems to have a higher maturation.

At 12 weeks, the group with bone formation processes is still the B+O. In addition, it is the group with a more homogeneous response, since in the case B+C+O there are large differences between cases, which show regenerated bone, with an irregular arrangement of the trabeculae and areas not yet fully mineralized.

Regarding the presence of remains of material, in a generalized way in all groups, these are either few or absent, which implies a degradation of material.

In the imaging study, as expected, as time progresses, the results found were better in terms of the induction of greater bone formation. Of the eight significant results in the statistic analysis, six were in the B+C+O, concluding that it is this group the one that induces greater bone regeneration, especially at 12 weeks, with better BV/TV, Tb.Th, Tb.N and cortical thickness. It is important to note that this significant positive effect is observed in both trabecular and cortical bone.

Discussion

Our present study was the first to investigate bioactive mesoporous glasses in a critical defect in an animal model, enhanced by adding an osteogenic and bactericidal ion such as zinc and an osteogenic and antiresorptive pentapeptide, osteostatin, in addition to mesenchymal cells. Our results, in summary, suggest that glasses containing Zn^{2+} with added mesenchymal stem cells and osteostatin significantly improve repair in critical defects due to the induction of bone formation at the same time as implant degradation occurs. However, in vivo studies with a greater number of controls will be necessary to allow a comparison with sufficient significance, complying with the standards of animal ethics, in higher animals such as sheep or pigs and with longer experimental times, necessary before the clinical use of these materials.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Biología ósea

2.1.1 Introducción

La regeneración ósea es un fenómeno natural que ocurre durante toda nuestra vida. El hueso, se modela y remodela para adaptarse a los cambios biomecánicos y para mejorar su calidad y resistencia. Esa capacidad del hueso, *restitutio ad integrum*, ocurre también en situaciones puntuales en las que el hueso necesita adaptarse a nuevos requerimientos de soporte como ocurre tras una fractura, una lesión tumoral, una infección o una pérdida de masa ósea.

Solo a partir del conocimiento de este proceso y de sus interacciones comprenderemos las soluciones que buscamos para tratar las patologías que le afectan.

2.1.2 Composición

El hueso está formado fundamentalmente por matriz ósea y células. La matriz ósea, posee un veinte por ciento de componente orgánico formado por colágeno tipo uno, proteínas (osteocalcina, osteonectina, osteopontina, proteoglicanos, citoquinas y factores de crecimiento), lípidos y osteoide. Y un componente inorgánico que constituye el setenta por ciento, principalmente compuesto por fosfato cálcico. La matriz mineral le confiere rigidez y la orgánica, resistencia y cierto grado de elasticidad (Miller, 2016).

El otro componente fundamental del hueso son las células con dos líneas de acción diferenciadas que necesitamos conocer para entender los mecanismos de reparación ósea. La línea osteoformadora se inicia con las células madre mesenquimales que se diferencian, mediadas por factores de transcripción (RUNX2 y otros), a osteoblastos y osteocitos. Los osteoblastos son las células formadoras de hueso, que sintetizan y secretan matriz ósea. Cuando se activan sintetizan el osteoide, regulan la mineralización e inician la resorción ósea. En la figura 1, se puede observar una representación esquemática de esta estructura.

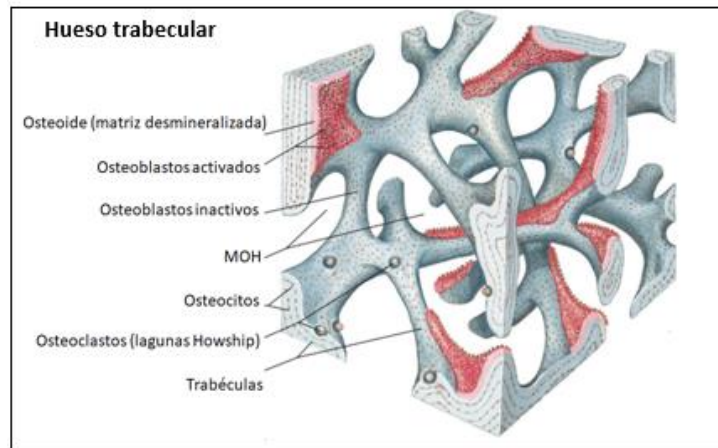


Fig 1. Representación esquemática de la estructura del hueso trabecular (modificación Netter)

Bajo el microscopio óptico los osteoblastos se reconocen por su forma cuboidea o poliédrica y su agrupación monoestratificada de tipo epitelioide en la superficie donde se está formando hueso. Poseen un núcleo excéntrico y un citoplasma amplio con un retículo endoplasmático muy desarrollado y abundante aparato de Golgi como corresponde a una célula productora de proteínas de matriz. Además, los que son maduros emiten unas prolongaciones delgadas hacia esa matriz que conectan con los osteocitos (Welsch et al, 2016).

Los osteocitos, son osteoblastos maduros que quedan atrapados en la matriz mineralizada. Se ocupan de mantener la homeostasis del calcio y el fósforo además de actuar como sensores para la reparación del hueso. Expresan proteínas como el factor de crecimiento fibroblástico que regula el metabolismo del calcio actuando sobre el riñón; la proteína de la matriz de la dentina que regula la mineralización de la matriz; o la fosfoglicoproteína de la matriz que inhibe la mineralización y cuya delección en animales de experimentación incrementa la masa ósea. El hecho de estar tan rodeados por la matriz formada podría suponer una característica negativa para establecer una comunicación celular, sin embargo, no ocurre así. Cada osteocito se instala en una cavidad conocida como laguna osteocitaria que contiene entre cuarenta y sesenta procesos dendríticos que emergen del cuerpo en todas direcciones y viajan dentro de canales estrechos llamados canalículos. Los osteocitos vecinos se ponen en contacto mediante estos procesos celulares y transmiten señales moleculares a través de esta compleja red lacunocanalicular que les permite

además de relacionarse entre ellos, comunicarse con otras células de la superficie y de la médula ósea.

Debido a esta posición estratégica los osteocitos son las células ideales para recibir los estímulos mecánicos siendo responsables de traducir la deformación mecánica en señales reguladoras de osteoblastos y osteoclastos. El concepto de que el esqueleto adapta su estructura a las cargas mecánicas fue inicialmente propuesto por Julius Wolff (1892) a través de su ley. A finales de los ochenta esta idea fue extendida por Harold Frost que desarrolló la hipótesis del mecanostato para explicar la adaptación ósea a las fluctuaciones mecánicas (Frost, 2003). Son esas fluctuaciones las que regulan la vida de los osteocitos. Niveles fisiológicos de carga mecánica reducen la apoptosis y la resorción ósea.

La línea destructora está compuesta por osteoclastos y mastocitos. Los osteoclastos son células gigantes multinucleadas, de estirpe monocito-macrófago, que reabsorben hueso. Su función principal es la de degradar la matriz ósea liberando calcio. Su acción está regulada por hormonas como la PTH, calcitonina e IL-6. Necesitan para su acción la activación de los osteoblastos que expresan RANK-L, que uniéndose a su receptor RANK lo activan iniciándose así la liberación de proteasas y degradando colágeno (figura 2). Otra proteína implicada en este proceso es la OPG. Segregada por células mesenquimales de la médula ósea, tiene una gran afinidad por el RANKL y lo inhibe evitando la formación de osteoclastos.

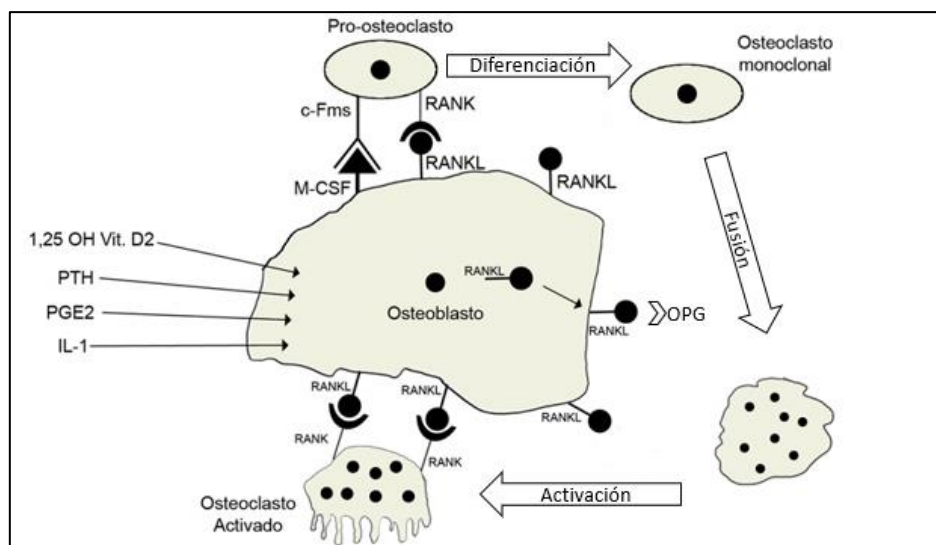


Fig 2. Vía de activación del osteoclasto

La regeneración ósea corre a cargo de las unidades básicas multicelulares formadas por osteoclastos que reabsorben hueso y osteoblastos que depositan osteoide. En este proceso de formación y destrucción se formarán dos tipos de hueso (Delgado, 2019). A nivel microscópico, fibrilar o inmaduro, que encontraremos en callos de fractura, huesos en crecimiento y en algunos procesos tumorales; y hueso laminar o maduro, producto de la remodelación de hueso existente. En el proceso de remodelación ósea el hueso inmaduro o fibrilar dará lugar a hueso maduro o laminar tras un correcto proceso reparativo.

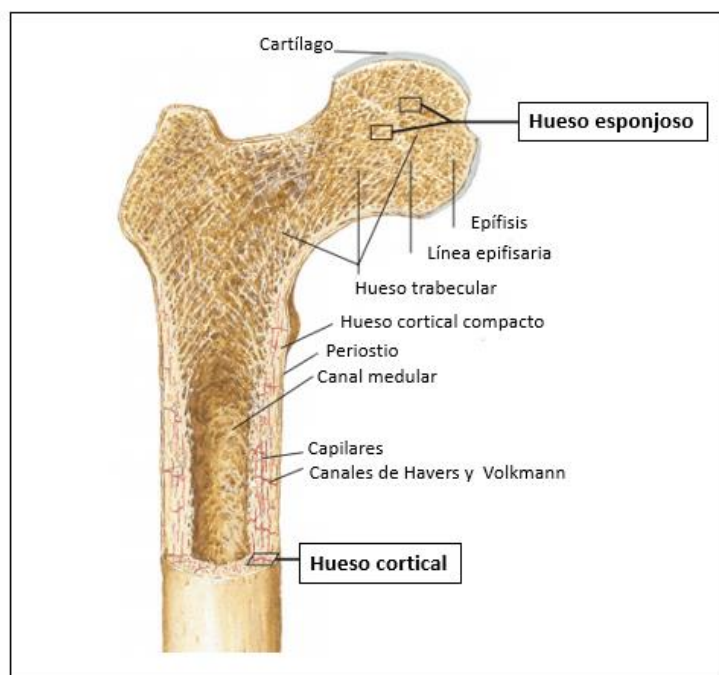


Fig 3. Representación esquemática de la estructura y composición del hueso (modificación Netter)

A nivel macroscópico, distinguiremos hueso esponjoso y hueso cortical, ambos representados en la figura 3 sobre la estructura y la composición del hueso (Smith et al, 2011). El hueso esponjoso o trabecular constituye aproximadamente un treinta por ciento del total de la masa ósea. Presenta un alto recambio óseo y un remodelado superficial y su misión es la de dar soporte estructural sin incrementar el peso del esqueleto debido a la interconexión que existe entre sus trabéculas. El hueso cortical o compacto se organiza en osteonas. Cada una de ellas contiene capas concéntricas

de matriz calcificada con osteocitos que se encuentran en lagunas. En el centro tienen un canal (canal de Volkmann) que permite el paso de vasos sanguíneos procedentes del periostio. Este hueso posee cierta porosidad a pesar de su denominación y presenta una tasa de recambio unas ocho veces inferior al esponjoso.

2.1.3 Modelado y remodelado óseo

- **Modelado:** es el proceso por el cual el hueso cambia de forma u orientación por la acción de las fuerzas mecánicas adaptándose así el esqueleto a la función a la que está sometido.
- **Remodelado:** proceso complejo mediante el que el hueso se renueva para mantener su resistencia y la homeostasis mineral, y que se realiza con la actividad coordinada de los osteoblastos y osteoclastos.

La regeneración ósea es un proceso continuo en el que la actividad osteoclástica (destructora) y la osteoblástica (formadora) se suceden de forma coordinada. El objetivo es que el hueso mejore su forma o su arquitectura para cumplir con sus funciones, principalmente como soporte mecánico.

El periodo de remodelado en humanos suele durar un tiempo de entre cuatro y seis meses con una primera fase en la que se produce la reabsorción y una segunda fase de formación ósea. Pero son muchos los factores que influyen en este proceso:

- Factores genéticos: la raza o por ejemplo enfermedades que disminuyen la síntesis de colágeno o el metabolismo de los mucopolisacáridos.
- La edad: a medida que aumenta, predomina la resorción ósea.
- Factores nutricionales: el calcio, el alcohol o la cafeína.
- Enfermedades concomitantes como la diabetes que retrasa la proliferación celular y reduce la osificación.
- Factores bioquímicos: PTH, vitaminas, citoquinas, factores de crecimiento, etc.

Uno de los factores más importantes en este proceso de remodelado es la PTH, hormona que juega un papel clave en la regulación de la homeostasis fosfocálcica. Pero en cualquier caso y dados los factores implicados, lo que es fundamental es que siempre debe existir un equilibrio entre la formación y la resorción del hueso para mantener constante la masa ósea. Un remodelado óseo elevado disminuye la resistencia ósea por alteración de la estructura y uno demasiado lento también, porque aumenta la posibilidad de microfracturas disminuyendo la calidad y por tanto también la resistencia de ese hueso.

Una vez finalizado este proceso, un hueso debidamente remodelado sustituirá al original. Pero hay situaciones en las que la capacidad de reparación ósea se ve superada y en las que se requiere una cantidad de regeneración que excede el propio potencial del tejido óseo. Estas situaciones son los grandes defectos de huesos largos provocados por traumatismos de alta energía, por resecciones tumorales amplias, por infecciones, por aflojamientos protésicos o por el tratamiento de determinadas deformidades esqueléticas.

2.2 Defectos óseos

2.2.1 Definición y tipos de defectos

El hueso es una estructura rígida con gran plasticidad morfológica. La interrupción de esa estructura, de esa continuidad ósea o cartilaginosa es lo que define un defecto óseo. El problema de su clasificación es la variedad de causas que los producen. Ejemplo de ello son las fracturas de alta energía, las resecciones tumorales, infecciones que precisan amplios desbridamientos, lesiones por explosión o cirugías para corrección de deformidades. Es difícil llegar a un consenso que sirva para distinguir unos de otros y decidir cuándo son críticos.

De forma general, los clasificamos en cavitarios, cuando producen una cavidad en el hueso y segmentarios, cuando falta un segmento de hueso (Bucholz et al, 2003). La clasificación por su tamaño, si bien está muy discutida en la bibliografía, es lo que va a determinar nuestro tratamiento y las decisiones respecto a su viabilidad.

Centrándonos en el objeto de esta tesis, los defectos segmentarios se clasifican en tres tipos en función de la pérdida ósea. Tipo 1, cuando afectan a menos del 50% del diámetro del hueso; tipo 2, si comprometen más del 50% pero se mantiene contacto en uno o más puntos de la cortical, y tipo 3, cuando el defecto no posee continuidad en ningún punto de la cortical. Según su longitud, tendremos defectos que pueden ser críticos cuando superan los dos centímetros.

2.2.2. Defecto óseo crítico

Los defectos críticos son, por definición, aquellos que tienen un tamaño tal que impide la reparación por los mecanismos habituales. Sin ayuda, no se repararían por sí mismos. En estos defectos están comprometidos los dos factores primordiales para la consolidación, la estabilidad y la vascularización. Por su tamaño, no van a presentar estabilidad mecánica. Habrá movilidad en el foco y falta de aposición de los fragmentos. Por su mecanismo de producción, traumático, tumoral o infeccioso, presentarán una pérdida de aporte vascular y, por tanto, una disminución de la tensión local de oxígeno, lo que afectará a la actividad celular y a su señalización.

En general, un defecto mayor a dos centímetros o que supere el cincuenta por ciento del diámetro del hueso en que se produce se define como defecto crítico. Pero esta definición depende en parte del hueso del que hablemos, su localización y el estado de los tejidos que lo rodean. De ahí la falta de consenso actual y de unificación de criterios.

2.2.3 Consolidación ósea

La consolidación es un proceso de regeneración tisular, no de cicatrización, que se da únicamente en tres tejidos de nuestro organismo; la córnea, el hígado y el hueso. El hueso se repara con su propia estructura y para ello necesita dos factores básicos que condicionan este proceso. Estabilidad, definida como ausencia de movilidad o de separación de los fragmentos, y vascularización.

Teniendo esto en cuenta podemos diferenciar dos tipos de consolidación:

- Directa, cortical o primaria: en defectos con reducciones anatómicas y, por tanto, estables. Sin participación de tejido cartilaginoso ni callo de fractura.
- Indirecta o secundaria: en fracturas inestables o defectos con movilidad interfragmentaria o amplio espacio entre los fragmentos.

La indirecta o secundaria sería el tipo de consolidación esperada en nuestro defecto. En ella, encontraremos un proceso de reparación con cinco fases en el tiempo que pueden solaparse. Una fase inicial de hematoma dará lugar a la fase de inflamación y posteriormente a la de reparación en la que se empieza a formar un callo blando por activación de osteoblastos o condroblastos en función de la presencia de oxígeno, alta en el primer caso, baja en el segundo. La cuarta fase es la de osificación encondral, que dará paso a la formación de hueso inmaduro fibrilar y posteriormente a hueso maduro, laminar tras la fase final de remodelación.

Cuando hablamos de defectos críticos son muchos los factores a tener en cuenta y que impiden que este proceso funcione. Los pilares básicos descritos dentro del concepto de diamante y definidos por Peter V. Giannoudis (Andrzejowski y Giannoudis, 2019) son cuatro, considerando un huésped con unas condiciones adecuadas y un buen aporte vascular: presencia de células, factores de crecimiento para su diferenciación, una estructura donde se fijen, proliferen y se desarrollen esos componentes celulares y un correcto entorno mecánico que proporcione estabilidad. En la figura 4 se representa de forma esquemática este concepto.

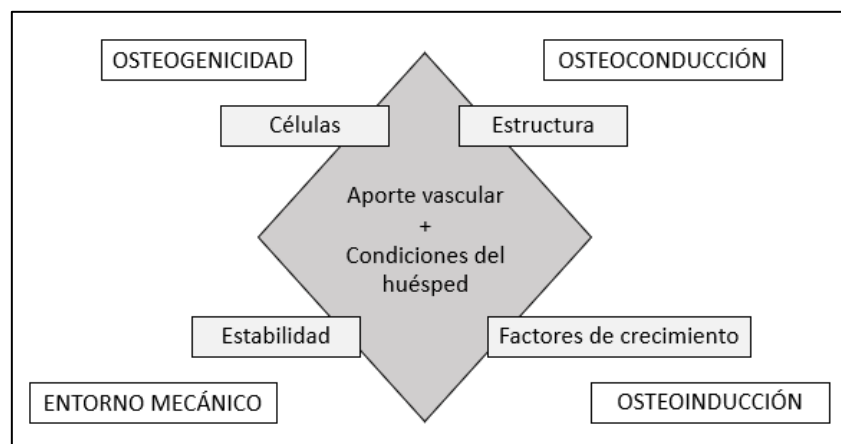


Fig 4. Representación esquemática del concepto de diamante

En los defectos críticos no tendremos entorno estable, ni una buena vascularización, ni estructura sobre la que generar hueso. Por ello los tratamientos se basan en la búsqueda de materiales que cumplan con esas condiciones bien en forma de injertos o de sustitutos óseos.

En un buen material buscaremos estas tres características:

- La osteogenicidad: capacidad de formación ósea. Depende fundamentalmente de las células, osteoblastos o indiferenciadas, que si encuentran unas condiciones óptimas podrán transformarse en osteoblastos y osteocitos y de esta forma participar en la formación de hueso nuevo.
- La osteoinducción: capacidad del material implantado para transformar células progenitoras osteocompetentes del huésped y mesenquimales en osteoblastos. Esta cualidad dependerá en gran parte de la presencia de factores de crecimiento.
- La osteoconducción: capacidad de un soporte o matriz para actuar como andamio para el crecimiento óseo proporcionando estabilidad mecánica y porosidad suficiente para albergar moléculas en sus canales. Sus propiedades vendrán determinadas por su configuración tridimensional y su capacidad de reabsorción.

Con estas bases, nos enfrentamos a la difícil búsqueda del sustituto óseo ideal.

2.3 Estrategias actuales de reparación para defectos óseos

Las principales estrategias de las que disponemos para reparar los defectos óseos en la actualidad son la regeneración ósea guiada, la osteodistracción, los injertos y los biomateriales.

2.3.1 Regeneración ósea guiada

La idea de la regeneración ósea guiada surgió en los años setenta, pero no fue hasta 1984 cuando Nyman y Gottlow introdujeron el término de osteopromoción definiéndose como la utilización

de materiales de barrera para conseguir la cicatrización de un área de hueso definida impidiendo así la invasión del defecto por células de tejidos competitivos no osteogénicos (Gottlow et al, 1984). Las células conectivas tienen una velocidad de proliferación superior a las células óseas (0.5 mm al día respecto a 50 μ m) además de acudir antes a las zonas de lesión. El concepto se basaba en interponer una barrera física que impidiese la invasión previa por esas células conectivas, más rápidas, manteniendo así un espacio delimitado con membranas que a su vez guían el crecimiento óseo. Desde entonces, se ha investigado mucho sobre los tipos de barreras que se podían utilizar. Pueden ser membranas no reabsorbibles, como las mallas de titanio o el politetrafluoretilo, que requieren la retirada. O reabsorbibles como las de colágeno o polímeros de láctico y glicólico, cada vez más utilizadas por su biocompatibilidad y capacidad de ejercer de barrera.

Recientemente en nuestra especialidad, ha cobrado interés la técnica descrita por Masquelet, que consiste en crear un tejido biológicamente activo, denominado membrana inducida, colocando temporalmente un espaciador de polimetilmetacrilato (PMMA) en el defecto óseo que se extrae a las seis semanas y se sustituye por injerto óseo o aspirado de médula ósea (Masquelet, 2017).

2.3.2 Osteodistracción

Esta técnica, más empleada en la corrección de deformidades que en el tratamiento de los defectos óseos, consiste en provocar una fractura y separar progresivamente los dos fragmentos de forma estable mediante el uso de fijadores externos estirando el coágulo de fibrina formado para crear un puente óseo.

2.3.3 Injertos óseos

Hoy en día disponemos de cuatro tipos de injertos óseos que empleamos en nuestra práctica clínica:

- Autoinjerto o injerto autólogo

El injerto autólogo de hueso esponjoso es y ha sido durante muchos años el patrón oro. Es osteogénico por sus células mesenquimales y osteoblastos; osteoinductor por los factores de crecimiento que posee y osteoconductor por su almacén de hidroxipatita y colágeno.

Puede ser de cortical, con menor número de células pero mejor soporte estructural, o esponjoso, con más células pero menor capacidad de soporte. Como desventajas, presenta una disponibilidad limitada, produce morbilidad de la zona donante y complicaciones descritas hasta en un cuarenta por ciento de casos en algunas series siendo las más frecuentes las lesiones neurológicas, el dolor, el hematoma o alteraciones estéticas de la cicatriz.

El más frecuentemente utilizado es el de la cresta iliaca. También el de peroné, metáfisis tibial o las costillas.

- Aspirado de médula ósea

Se trata de un concentrado de células precursoras mesenquimales con capacidad osteogénica. Su obtención puede ser de cresta iliaca, fémur, tibia o cuerpo vertebral, pudiendo implantarlo en el momento de la extracción o tras su cultivo para la expansión celular en laboratorio.

El más utilizado en la actualidad es el fresado-aspirado de médula ósea con sistema RIA (Reamer Irrigation Aspiration) empleado para pseudoartrosis o defectos óseos segmentarios de huesos largos ya que produce más volumen de injerto que el obtenido de cresta iliaca (Cox et al, 2011).

- Aloinjerto

Injerto procedente de hueso de miembros de la misma especie de un banco de tejidos. Fresco, congelado, liofilizado o desmineralizado. Sin capacidad osteogénica y con menor potencial osteoinductor por los procesos de esterilización que precisa para su implantación.

Si bien su disponibilidad es ilimitada, presenta como desventajas que precisa de la infraestructura de un banco de huesos y donantes, puede desencadenar respuesta inmune y transmitir enfermedades con una probabilidad de uno por un millón.

- Matriz ósea desmineralizada (MOD)

Aloinjerto tratado para eliminar su componente mineral, pero dejando la estructura colágena y proteínas no colágenas incluyendo factores de crecimiento. Mantienen una estructura similar a la trabecular ósea, pero sin capacidad osteoconductora y sin ofrecer soporte estructural. Es osteoinductora al producir actividad osteocondrogénica de las células pluripotenciales y osteoclastos.

2.3.4 Biomateriales

Un biomaterial es un material diseñado para actuar con sistemas biológicos con el fin de tratar, aumentar o reemplazar algún tejido, órgano o función del cuerpo. En concreto, como sustitutos óseos empleamos materiales naturales o sintéticos que semejan algunas características estructurales del hueso, tratan de restaurar el defecto existente y en algún caso, conseguir la regeneración tisular sin poder proporcionar gran resistencia a la carga (Gómez Barrena et al, 2020). Deben ser compatibles con el organismo para evitar un efecto inflamatorio, porosos para permitir la invasión celular y vascular, y rápidamente biodegradables para no modificar las propiedades mecánicas del tejido a reparar.

Respecto a los tipos de biomateriales varias han sido las clasificaciones propuestas. Atendiendo a su origen podemos hablar de biomateriales naturales o sintéticos. Si el criterio es la respuesta que produce en el organismo hablaremos de activos, cuando inducen la formación de hueso o inertes, si no intervienen en la osteogénesis, añadiendo a esto el hecho de ser biodegradables o no. En cuanto a su naturaleza química distinguimos los sintéticos o artificiales y los de origen biológico.

Clásicamente se dividen en tres grupos; metales, polímeros y cerámicas. Hablaremos de este último grupo dado el interés para nuestro proyecto.

Cerámicas

Las cerámicas son biomateriales inorgánicos no metálicos. Se clasifican en:

- Inertes: Alúmina (Al_2O_3), circonio.

Presentes desde la primera generación. Las actuales, ya de tercera, se obtienen por síntesis a elevada presión y temperatura de polvo cristalino, consiguiendo unas cerámicas de alta pureza y grano pequeño para disminuir su fragilidad.

Poseen excelentes propiedades tribológicas, pero también un coste elevado.

- Bioactivas

Como cerámicas de segunda generación encontramos las bioactivas y biorreabsorbibles.

- Compuestos de fosfato cálcico: son compuestos inorgánicos de degradación muy lenta y que presentan actividad en el tejido vivo por su enlace químico directo con el hueso, pero no son osteoinductores. Forman osteoide que se mineraliza, reabsorbe y se sustituye por hueso. Pueden implantarse en gránulos, bloques, cementos o como recubrimiento de implantes. Las más utilizadas son la hidroxiapatita y el fosfato tricálcico. Entre sus propiedades destaca la gran resistencia a la compresión, pero son frágiles frente a la torsión, flexión, cizallamiento y tensión por lo que están indicados para relleno de cavidades óseas, aumentación en hueso osteoporótico y artrodesis de columna, pero no sirven como sustitutos en hueso diafisario.
- Vidrios bioactivos: compuestos generalmente basados en sílice amorfa a la que se le añaden cantidades de otros óxidos. Son biodegradables y liberan iones con propiedades osteoinductores.
- Sustitutos óseos coralinos: comercializados como coral natural o hidroxiapatita coralina. Son buenos transportadores para factores de crecimiento y células.

- Compuestos de sulfato cálcico: yesos utilizados para el relleno de cavidades óseas. Destacan por su biocompatibilidad y buen precio, pero presentan escasa resistencia mecánica y rápida reabsorción. Se comercializan en forma de bloques, gránulos o inyectables.
 - Biocerámicas de tercera generación
- Vidrios mesoporosos bioactivos: utilizados como matrices en equivalentes tisulares en la ingeniería de tejidos por su porosidad interconectada y jerárquica con poros de varios órdenes de magnitud que permiten tanto la liberación de fármacos, como la angiogénesis interna y la liberación de células en su interior.

Actualmente recurrimos en muchos casos a la combinación de estos biomateriales descritos para la curación de grandes defectos.

2.4 Ingeniería de tejidos

La ingeniería tisular es un campo interdisciplinar que aplica los principios de la biología y la ingeniería para el desarrollo de estrategias que combinan matrices biocompatibles, factores de crecimiento, trasplantes celulares y terapias de liberación génica para recuperar la estructura y función del tejido al que debe reemplazar.

2.4.1 Matrices

En los tratamientos de ingeniería tisular se requieren estructuras donde colocar y transportar los factores de crecimiento junto con las células. Estos transportadores deben ser compatibles con el organismo para evitar reacciones inmunológicas, inflamatorias o tóxicas; porosos para permitir la invasión celular y vascular, y rápidamente biodegradables dando tiempo a que se produzca la migración celular y la angiogénesis, pero sin comprometer con sus residuos de degradación las propiedades mecánicas del tejido a reparar. Hoy en día disponemos de algunos biomateriales con capacidad osteoconductora o de andamiaje, cuya magnitud varía en función de la porosidad de cada material (Salinas et al, 2013). En el caso de grandes defectos óseos, deberán en la medida de lo posible actuar como soporte mecánico.

Se han descrito cuatro tipos de transportadores: materiales inorgánicos, polímeros sintéticos, polímeros naturales y composites o compuestos de los materiales citados previamente. Entre los materiales más utilizados está el colágeno tipo 1, los geles de ácido hialurónico o los biomateriales expuestos previamente como son el fosfato cálcico, la hidroxiapatita o el coral.

Tras años de investigación nuestro grupo ha realizado grandes avances en la búsqueda del material ideal centrándose en los vidrios. Los vidrios los podemos clasificar en tres tipos según su obtención por diferentes métodos sintéticos. Los de primera generación, los vidrios de fusión obtenidos por enfriamiento rápido de una mezcla de óxidos a altas temperaturas sin darle tiempo a cristalizar y descritos por Hench (1973), incluían en su composición SiO_2 , sílice, Na_2O y CaO . El primero comercial, denominado Bioglass®, se obtuvo mediante el método tradicional mezclando SiO_2 - CaO - Na_2O - P_2O_5 . La segunda generación, los vidrios sol-gel, empleaban el sistema SiO_2 - CaO - P_2O_5 . La tercera generación, combinaba las estrategias sol-gel con conceptos de química supramolecular. En la siguiente tabla pueden ver las características de cada grupo.

Tabla 1: Características de las tres generaciones de vidrios

	Vidrios de fusión	Vidrios sol-gel	Vidrios mesoporosos
Síntesis	Masa fundida	Sol-gel	Sol-gel+supramolecular
Propiedades	Polvo denso	Mesoporos heterogéneos	↑Mesoporos homogéneos
Actividad in vitro	Muy rápida	Muy rápida	Extremadamente rápida
Adición de iones	Si	Si	Si
Procesamiento	Andamios	Andamios, fibras, recubrimientos	Andamios, fibras, recubrimientos
Carga de moléculas	No	Limitado	Si

El desarrollo de los VM en la década de 2000, marcó un avance sustancial en el diseño de los biomateriales que se podían emplear en la ingeniería de tejidos. El éxito de un andamio sintético depende de si cumple de forma similar con los requisitos a los encontrados en la naturaleza para el desarrollo normal del hueso. Los huesos naturales poseen una porosidad jerárquica en la gama de 1 a 3500 μm que es necesaria para sus funciones fisiológicas (Arcos y Vallet-Regí, 2010).

Poros de tamaño mayor que 100 μm permiten la colonización celular, vascularización y el crecimiento interno de tejido vivo. Los microporos, menores de 2 nm, y los mesoporos, entre 2 y 50 nm, promueven la adherencia de la célula, la adsorción de metabolitos biológicos y la resorción a una velocidad controlada que se ajusta al tiempo necesario para la reparación del tejido vivo (Gerhardt y Boccaccini, 2010). Los andamios de VM poseen una red macroporosa de canales de 1 a 100 μm , bien interconectada, junto con mesoporos que permiten transportar y liberar de una forma controlada sustancias con actividad terapéutica (Wu et al, 2011a) y por ello, se convierten en candidatos óptimos para albergar fármacos y otras biomoléculas con actividad biológica. Recientemente, numerosos iones inorgánicos como el cerio, el galio o el zinc y sus acciones se están estudiando en sistemas diversos de vidrios (Valappil et al, 2009). Tanto in vitro como in vivo, la disolución de estos metales en la propia estructura de los vidrios induce y aumenta la respuesta celular y la activación de señales para la expresión de los genes de las células osteoprogenitoras. El cerio tiene un efecto positivo en osteoblastos primarios de ratón in vitro y las nanopartículas de óxido de cerio actúan como agentes neuroprotectores (Schubert et al, 2006). El galio aumenta el contenido de calcio del hueso, inhibe la actividad de los osteoclastos y muestra una actividad antimicrobiana (Hall y Chamberts, 1990). El zinc por su parte tiene un efecto estimulador en la formación del hueso y también muestra actividad antimicrobiana (Aydin Sevinç y Hanley, 2010). Estos estudios motivaron a la incorporación de pequeñas cantidades de xCe_2O_3 , xGa_2O_3 o xZnO en los vidrios sol-gel y VM bioactivos de composición $(80-x) \text{SiO}_2$ -15%CaO-5%P₂O₅ (mol %). Además de ser ideales para la liberación de fármacos como ya se había demostrado, mostraron capacidad antimicrobiana (Shruti et al, 2013). Ambas características nos han llevado a seleccionarlos como soportes idóneos en el presente proyecto dado el tipo de defecto óseo de gran tamaño en el que lo vamos a emplear y las condiciones del huésped.

2.4.2 Células

La terapia celular implanta células con poder diferenciador directamente en el lugar donde son necesarias. No sólo la capacidad proliferativa y diferenciadora es la base de su aplicación clínica

sino también la de segregar factores bioactivos, inductores e inmunomoduladores con influencia indirecta pero determinante también en su acción.

En nuestra especialidad y centrándonos en el hueso, este proceso se lleva a cabo empleando cuatro protocolos: médula ósea fresca, células mesenquimales pluripotenciales cultivadas, células diferenciadas a osteoblastos y condrocitos o células tratadas genéticamente para expresar sustancias monogénicas. Las fuentes celulares que obtenemos son células autólogas, alogénicas y xenogénicas. Según su capacidad de diferenciación distinguimos entre aquellas que no tienen restricción y son capaces de diferenciarse en cualquier línea, las células multipotenciales y las células diferenciadas.

En el grupo intermedio encontramos las células mesenquimales pluripotenciales (MSC). Estas células están presentes en la médula ósea, tejido adiposo, sangre periférica o placenta fetal y materna, de donde se obtienen con facilidad. Poseen una gran capacidad de autorrenovación, proliferación y de migración a distintas partes del cuerpo. Son buenas para los ensayos clínicos porque permanecen estables durante periodos de seis a ocho semanas ex vivo para su manipulación además de no generar problemas inmunológicos y no plantean los problemas éticos de las células embrionarias puesto que no se han observado diferenciaciones tumorales.

En nuestro caso, planteamos su obtención a partir de la grasa del animal, pero para no sumar morbilidad, optamos por comprar y utilizar células comerciales obtenidas de aspirado de médula ósea de cresta iliaca humana de voluntarios sanos (MSCBM; Lonza, Walkersville, MD, USA). Compradas en Suiza desde donde se distribuyen al mercado europeo, las células de Lonza son células mesenquimales derivadas de médula ósea humana en estado indiferenciado que se mantienen en medio basal, MSCBM, medio que contiene suero preparado específicamente para garantizar que no se produzca la diferenciación espontánea de las mismas. Cada vial contiene al menos 0,75 millones de células viables que diferencian los linajes adipogénicos, condrogénicos y osteogénicos cuando se cultivan en el medio de diferenciación recomendado.

Con respecto a este punto, queda un largo camino por recorrer para entender cómo se integran estas células en la cascada reparadora después de una lesión, cómo se replican y qué marcadores de superficie las distinguen con seguridad. La reparación ósea precisa de células

osteocompetentes en el lugar de la lesión, pues sin ellas no hay osteogénesis. El enfoque actual más generalizado es su liberación directamente en el lugar de reparación a partir de médula ósea aspirada de la cresta iliaca. Sin embargo, la concentración y calidad celular ha llevado al desarrollo de métodos de cultivo y multiplicación con el objetivo de disponer de concentrados con mayor número de células. Tras encontrar problemas éticos y cierto descontrol en su multiplicación, se comenzó a investigar a partir de células obtenidas de sangre periférica, grasa y músculo. Desde el año 2003, se han publicado resultados indicando que las células mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASC) diferenciadas hacia la línea osteogénica, embebidas en una matriz de ácido poliglicólico e injertadas en el tejido subcutáneo de rata, son capaces de formar hueso (Lee et al, 2003). En otro estudio, ASC osteoinducidas in vitro y sembradas en una matriz de coral fueron capaces de reparar defectos de calota en modelos caninos (Cui et al, 2007). En cerdos, demostraron que, tras cuatro semanas implantadas directamente en el defecto e inyectadas intravenosas mejoraban la cicatrización en osteotomías mandibulares de 10 milímetros (Wilson et al, 2012). Sin embargo, quizá es el elemento más desconocido aún en la ingeniería tisular. Su identidad in vivo, heterogeneidad, ubicación anatómica y roles funcionales en la homeostasis del tejido adulto están comenzando a descubrirse (Nombela-Arrieta et al, 2011). En cualquier caso, no cabe duda de que en un futuro no muy lejano, las MSC serán un elemento clave en el desarrollo de nuevos equivalentes tisulares como sustitutos óseos (Kim et al, 2019).

2.4.3 Señales

En ingeniería tisular las señales son proteínas secretadas por las células con efecto osteoinductor al actuar sobre células diana induciendo una división celular o la síntesis de matriz. Esencialmente, todos los tejidos del sistema musculoesquelético producen y responden a estos factores que tienen una importante función en el crecimiento y desarrollo, pero también están implicados en procesos patológicos, así como de daño y reparación de los tejidos.

Los factores de crecimiento relacionados con el sistema musculoesquelético son en su mayoría mitogénicos y estimulan por tanto la proliferación celular. Se dividen en: transformadores del crecimiento (TGF), de crecimiento fibroblástico (FGF), de crecimiento plaquetario (PDGF), insulinoides (IGF) y epidérmicos (EGF). Nos centraremos en los que más interés tienen en nuestro proyecto.

Proteínas morfogenéticas óseas

En la actualidad y dentro de este campo disponemos de las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) para uso compasivo en defectos óseos de gran tamaño, pseudoartrosis de huesos largos o artrodesis en cirugía de columna. Desde su descubrimiento, un gran número de estudios experimentales y clínicos han avalado su seguridad y eficacia (Cook S.D., 1999). Las BMP son proteínas que pertenecen a la subfamilia del TGF. Son los únicos factores que además de estimular la multiplicación de las células conectivas, son capaces de transformarlas en células osteoprogenitoras. Es decir, son las únicas conocidas hasta ahora que pueden comenzar la cascada completa que lleva a la formación ósea. Se consideran osteoinductoras las BMP 2, 4, 6 y 7. Y todas ellas se encuentran autorizadas para su uso compasivo por la Agencia Europea del Medicamento, si bien las dos expuestas a continuación son las que más estudios tienen.

- BMP-7 (rhOPG1, Osigraft®): diferencia las células a osteoblastos más rápido evitando el paso intermedio a tejido cartilaginoso, saltando así el proceso de osificación condral. Autorizada en pseudoartrosis atrófica de huesos largos. Muy utilizada en ensayos clínicos para inducir regeneración ósea y como método añadido a la técnica de osteogénesis a distracción y transporte óseo.
- BMP-2 (rhBMP-2, InductOs®): factor osteoinductor que induce la diferenciación condrogénica de células mesenquimales. Autorizada para artrodesis lumbar además de pseudoartrosis de tibia.

Con la utilización de la tecnología recombinante-ADN, las BMP 7 y 2 fueron aprobadas por la FDA para su uso en estas indicaciones específicas desde 2001 y 2002 respectivamente. Pero su precio elevado y su disponibilidad nos ha llevado a investigar en otras líneas.

Factores derivados del crecimiento plaquetario

Los PGDF son los factores séricos que tienen más actividad mitogénica en un amplio rango de tipos celulares. Incluyen la PDGF-AA, PDGF-AB y PDGF-BB. Están presentes en grandes concentraciones en plaquetas y células del endotelio vascular. Tras obtener sangre y centrifugarla se obtiene un plasma rico en plaquetas que libera factores de crecimiento que a su vez estimulan la activación, duplicación y crecimiento de las células mesenquimales (osteoblastos, fibroblastos y células endoteliales). Los estudios preclínicos con PDGF-BB han demostrado mejorar la angiogénesis y estimular la reparación de las fracturas.

Actualmente está disponible en su forma recombinante para el tratamiento de defectos óseos periodontales y para la artrodesis de pie y tobillo.

PTH, PTHrp y osteostatina

En la búsqueda de moléculas que permiten la modulación celular para inducir la formación de tejido óseo se ha investigado mucho acerca de la PTH. Esta hormona es un péptido de 84 aminoácidos cuya secreción está regulada por la concentración de calcio sérico. El calcio en sangre aumenta sus niveles cuando existe hipocalcemia. A nivel óseo su acción es compleja y dependiente de las dosis puesto que puede activar a los osteoblastos y a los osteoclastos. La exposición intermitente lleva a un aumento neto de la formación de hueso mientras que la exposición continua produce la pérdida ósea (Lozano et al, 2014). Su acción se lleva a cabo eliminando hueso a través del aumento de la reabsorción por parte de los osteoclastos que expresan RANK-L disminuyendo así la OPG. Junto a otros factores como las citoquinas o los factores de crecimiento, podría ser una señal clave en el ámbito de la ingeniería tisular. De ahí el estudio específico de sus acciones y su composición.

En la actualidad ya se están utilizando en la clínica dos PTH análogas, la PTH 1-34 (teriparatida) y la PTH 1-84, como agentes anabolizantes para la osteoporosis grave. El péptido PTHrp es un agente regenerador óseo cuyo fragmento N-terminal es análogo a la PTH y su porción C-terminal incluye la fracción 107-111 llamada osteostatina. Esta molécula ha mostrado su eficacia en cuanto a la capacidad de inducir proliferación y calcificación sobre hueso sano, así como en modelos de hueso osteopénico. La administración intermitente del fragmento N-terminal de la PTHrp actúa bloqueando el receptor PTH1R y produciendo la activación de la PKA de la misma manera que hace el mismo fragmento de la PTH. En hueso osteoporótico de roedores y humanos se ha visto cómo produce un aumento del volumen del hueso esponjoso y el grosor cortical además de mejorar su resistencia (Lozano et al, 2012). El fragmento C-terminal tiene capacidad antirresortiva pero también actividad osteogénica. Esta porción no interactúa con el PTH1R pero podría activar la PKA en las células osteoblásticas produciendo una señal al abrir los canales de calcio. En estudios recientes de hecho se ha demostrado su acción por la activación del VEGFR2. En el siguiente esquema se representa la actividad relacionada con la osteostatina (figura 5).

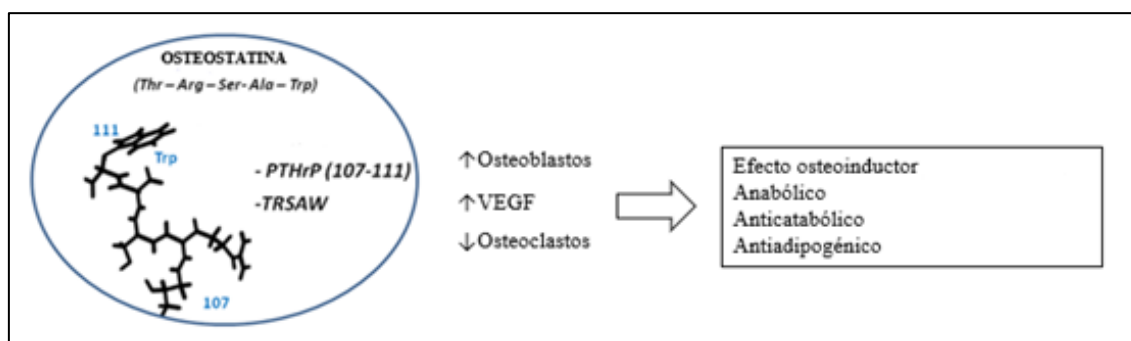


Fig 5. Acciones de la osteostatina, pentapéptido fragmento del PTHrp

Teniendo en cuenta la variedad de moléculas que permiten la modulación de las células para inducir la formación de tejido óseo, la elección en este proyecto de la osteostatina se basó en su eficacia demostrada en estudios previos como modulador óseo. Esta molécula, es en concreto la fracción 107-111 del PTHrp, péptido recombinante humano análogo. Tras ensayos en modelos experimentales de reparación de defectos cavitarios en hueso largo ha mostrado su eficacia en

cuanto a la capacidad de inducir proliferación y calcificación sobre hueso sano, así como en modelos de osteoporosis (Trejo et al, 2010). Tras sus buenos resultados, utilizarla para un defecto crítico nos parecía una buena propuesta para continuar demostrando sus beneficios.

2.5 Elección del tema y estado actual

La actuación terapéutica en el campo de la cirugía ortopédica y de la traumatología se asienta sobre los principios biológicos de la regeneración ósea, en los que están implicadas las células, la matriz extracelular y las señales osteoinductoras. En la actualidad, disponemos de múltiples estrategias para superar las condiciones inadecuadas que dificultan el proceso de reparación de un hueso dañado. Si bien la utilización de injertos óseos autólogos, aloinjertos óseos, andamios osteoconductores sintéticos o procedimientos como la osteogénesis con membranas son cada vez más empleados, seguimos teniendo un número creciente de pacientes con grandes defectos estructurales de huesos largos por accidentes, tumores, infecciones o aflojamientos protésicos que nos generan un desafío constante. A pesar de las innovaciones tecnológicas tendremos que estar preparados para su incremento en los próximos años. La utilización de implantes de cadera en países desarrollados continúa aumentando con una tasa de crecimiento anual del 1.2%, lo que supone un aumento de 1.8 millones por año (dato de 2015) a 2.8 millones (2.6-2.9) en el año 2050. En cuanto a la artroplastia de rodilla, la más utilizada en la actualidad, se espera un aumento a nivel mundial del 143% para el año 2050. Por tanto, no sólo hablamos de los recambios futuros de las prótesis ya implantadas sino también de un aumento exponencial tanto de cirugías primarias como de revisiones en los próximos años. En el campo de la cirugía tumoral hemos pasado de la cirugía mutilante a la cirugía conservadora, sin duda, debido a las mejoras en la tecnología de imagen, los avances en los protocolos oncológicos y el desarrollo de prótesis tumorales asociadas al uso de homoinjertos. En el campo de las infecciones, cada vez optamos más por la cirugía de preservación del miembro gracias a los tratamientos con antibioterapia crónica. En cuanto a los traumatismos de alta energía, los protocolos de control de daños están aumentando la supervivencia de muchos pacientes con defectos óseos por impactos de alta energía al igual que

ocurre con el aumento de la supervivencia gracias a la menor muerte fetal y al diagnóstico precoz, de niños con deformidades que precisan correcciones. Esto convierte este campo en un reto actual y creciente, donde se necesitarán equipos multidisciplinares para el manejo de las cirugías de revisión y el tratamiento de los defectos óseos.

Predecir el futuro siempre es algo arriesgado. Pero la tendencia que podemos observar desde hace años es que casi con toda seguridad primará lo biológico sobre lo quirúrgico. El traumatólogo del futuro pasará del bisturí y las tijeras a la pipeta, el microscopio, las placas de cultivo y las impresoras 3D.

El desarrollo y puesta en el mercado de los materiales que hoy en día empleamos es un proceso tan largo que los que se están utilizando en la actualidad están fabricados con materiales desarrollados en los años ochenta y noventa como la hidroxiapatita y BMP (Salinas et al,2013). Las limitaciones principales se deben a que los biomateriales disponibles presentan una capacidad escasa para promover la regeneración y sustituirse por tejido resultante; la logística para la producción celular autóloga es compleja; la variabilidad celular asociada a la genética y a la edad es aún desconocida; y la combinación célula y material para conformar el producto final y obtener la autorización de las agencias regulatorias, supone un proceso lento y complejo. Nos queda la opción de seguir investigando y estar preparados para ese futuro...ya casi presente.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Hipótesis de trabajo

Los vidrios mesoporosos bioactivos combinados con zinc, osteostatina y células madre mesenquimales constituyen un nuevo equivalente tisular que puede llegar a utilizarse en clínica humana.

Objetivo principal

Analizar la reparación ósea de un defecto crítico de conejo a nivel radiocubital a través de un análisis histológico y de imagen, tras implantar un equivalente óseo fabricado a partir del VM bioactivo 76%SiO₂-15%CaO-5%P₂O₅-4%ZnO enriquecido con osteostatina y/o células mesenquimales.

Objetivos secundarios

1. Validar el conejo como modelo animal para estudiar los defectos óseos críticos.
2. Caracterizar estructuralmente tanto el vidrio de partida como los soportes fabricados adecuando la cantidad y la forma ideal de adsorción de los componentes, de forma que sean aptos para el defecto creado y resistentes biomecánicamente.
3. Ensayar in vivo la biocompatibilidad y aplicabilidad de los soportes implantados.
4. Realizar un seguimiento de 6 y 12 semanas con controles de imagen e histopatológicos.
5. Validar una metodología para la cuantificación ósea integrada en una herramienta software, BoneAnalytics, que permita realizar distintas medidas para el estudio de hueso trabecular y cortical.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Síntesis del material

La síntesis y caracterización fisicoquímica e in vitro de los materiales implantados, paso previo a su implantación y estudio de su comportamiento in vivo que constituyen el objetivo de esta tesis, son parte de la tesis de Clara Heras que será presentada en los próximos meses en la Facultad de Farmacia de la UCM y que han sido publicados por el grupo de investigación en la revista Acta Biomaterialia (Heras et al, 2020). Sin embargo, es necesario incluir aquí una breve descripción de los principales resultados en este sentido para conocer mejor los materiales implantados: cómo se sintetizaron los vidrios y su composición, cómo se cargaron con osteostatina y cómo se decoró su superficie con células mesenquimales que penetraron hasta el interior de los poros.

- **Síntesis del vidrio mesoporoso bioactivo**

Se han fabricado soportes biocerámicos a partir de un vidrio mesoporoso bioactivo que presenta una alta superficie específica y un gran volumen de poros. Estos soportes, que tienen una composición 76%SiO₂-15%CaO-5%P₂O₅-4%ZnO (% en moles), se denominan 4ZN a lo largo de esta memoria por su contenido en ZnO. El método de preparación ha sido una combinación sol-gel con el autoensamblaje inducido por evaporación del disolvente, método EISA.

En la figura 6 se expone un esquema del proceso de síntesis.

- **Caracterización químico-física del vidrio mesoporoso bioactivo**

Para controlar y poder reproducir sus propiedades finales se realizó una exhaustiva caracterización estructural y textural de los vidrios empleando técnicas como el análisis químico con fluorescencia de RX y plasma ICP, el análisis elemental CHN (CAI de la UCM), el análisis térmico diferencial y análisis termogravimétrico (TGA) o la microscopia electrónica de barrido (CAI CNME de la UCM).

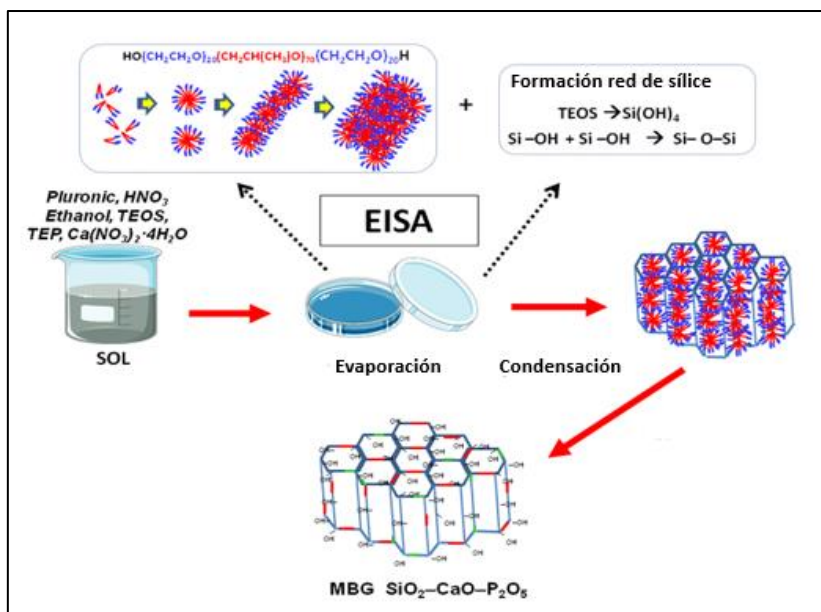


Fig 6. Proceso de síntesis del VM

- **Fabricación de andamios macroporosos por impresión 3D**

Los soportes con macroporosidad interconectada (10-1200 µm) se han fabricado por prototipado rápido, proceso asistido por ordenador que imprime en 3D el modelo diseñado utilizando a modo de tinta una pasta con el VM. Así hemos realizado los soportes con la morfología adaptada al tamaño y forma del defecto óseo. El tamaño final fue de 15mm de longitud por 6-7 mm de diámetro.

Para la fabricación de los andamios, los vidrios obtenidos se trituraron y tamizaron en una malla de 40 µm para obtener los polvos de vidrio. Luego se dispersaron en diclorometano (DCM), seguido de la adición de e-policaprolactona (PCL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta conseguir la consistencia para la manipulación en una impresora 3D, BioplotterTM (EnvisionTEC, Gladbeck, Alemania), equipo de prototipado rápido. Los andamios se secaron a 37° C durante 24 horas para evaporar el DCM y luego se trataron a 700° C durante 6 horas para eliminar la PCL. Los armazones resultantes 4ZN se recubrieron con gelatina entrecruzada con glutaraldehído (GA) (2,4% peso/volumen) para mejorar sus propiedades mecánicas (ver figura 7).

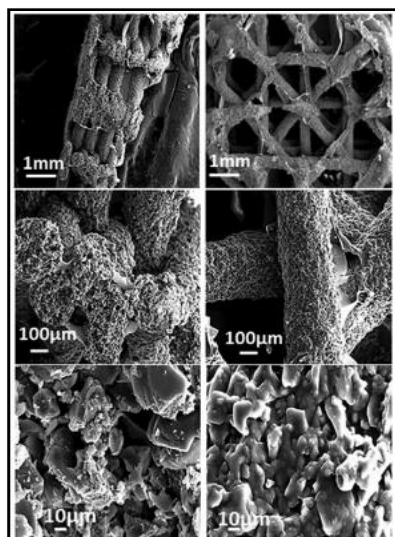


Fig 7. Imágenes 3D de un corte y de la superficie de los andamios con zinc (4ZN)

- **Ensayos de degradación y bioactividad en disoluciones acelulares**

Este apartado se realizó sumergiendo los materiales en el fluido corporal simulado (SBF) propuesto por Kokubo a 37°C. Las variaciones iónicas en la solución se analizan en un sistema Ilyte. Para asegurar una correcta osteointegración del implante se estudió asimismo su cinética de degradación en condiciones in vitro. Para ello, los sistemas se sumergen en disoluciones acelulares que simulan las condiciones fisiológicas (pH, flujo y temperatura) y se determinan los iones (Si, Ca, P y Zn) y otras especies liberadas al medio utilizando técnicas de electrodo de ion selectivo (Ilyte), plasma ICP y técnicas espectroscópicas.

- **Adsorción de agentes osteogénicos**

Una vez fabricados y esterilizados con luz ultravioleta, algunos de estos andamios, piezas B+O, fueron cargados con osteostatina a una concentración de 100 nM junto a solución de PBS o medio de cultivo y con agitación continua durante 24 horas a 4°C. La osteostatina se incorpora por impregnación a nuestro VM. Previamente se había realizado el estudio con diferentes concentraciones, disolventes, tiempos de impregnación, cinéticas de liberación, etc.

En los grupos B+C y B+C+O, se cultivaron las células madre mesenquimales humanas en medio basal, medio que contiene suero bovino fetal al 10%, L-glutamina 1 mM y un 1% de penicilina-estreptomicina a 37 °C en un ambiente humidificado con atmósfera de CO₂ al 5%. La siembra se realizó con una concentración de 350000 células por pieza. La unión celular a los andamios fue estudiada por microscopía de fluorescencia. Su crecimiento se determinó después de 4 días de cultivo mediante el método Alamar Blue (AbD Serotec, Oxford, Reino Unido), siguiendo las instrucciones del fabricante.

- **Estudios de biocompatibilidad in vitro**

Gracias a la disponibilidad en el laboratorio de células osteoblásticas y osteoblastos humanos de donantes sanos suministrados por Lonza, pudimos realizar estudios de biocompatibilidad. En ellos, valoramos la extensión y colonización celular (por SEM, ESEM y microscopia confocal), la proliferación celular, la diferenciación celular, la síntesis de colágeno y la citotoxicidad.

- **Elección del biomaterial definitivo**

Tras los estudios in vitro y los resultados iniciales se optó por el VM 76%SiO₂-15%CaO-5%P₂O₅ con 4% de ZnO (4ZN). Al añadir los iones de Zn²⁺ a esas dosis, las piezas mostraron características análogas en el tipo y la forma de los poros presentes sin sufrir modificaciones en su estructura.

Los andamios se recubrieron por inmersión en gelatina al 2,4% en peso/volumen. La gelatina se eligió como polímero endurecedor por ser una forma hidrolizada de colágeno, componente principal de la matriz extracelular de la mayoría de los tejidos, biocompatible y con baja antigenicidad además de por su alta bioabsorción in vivo.

Respecto a la impregnación del VM con osteostatina, se comprobó que el mecanismo de difusión a través de los mesoporos considerando la baja solubilidad de los vidrios al pH medio (7.4), ocurre siguiendo el comportamiento de la liberación de péptidos descrita por la ecuación de Noyes-Whitney siendo la liberación más rápida en las primeras 24 horas y alcanzando una fase estacionaria después de 48 horas (figura 8). Pequeñas desviaciones podrían deberse a factores

como el volumen peptídico, la distorsión de los canales mesoporosos o la liberación de moléculas peptídicas adsorbidas en la superficie externa de las matrices antes y después de la osteostatina. Por ello se decidió añadir una segunda impregnación 100 nM en las 24 horas previas a la implantación definitiva de las piezas.

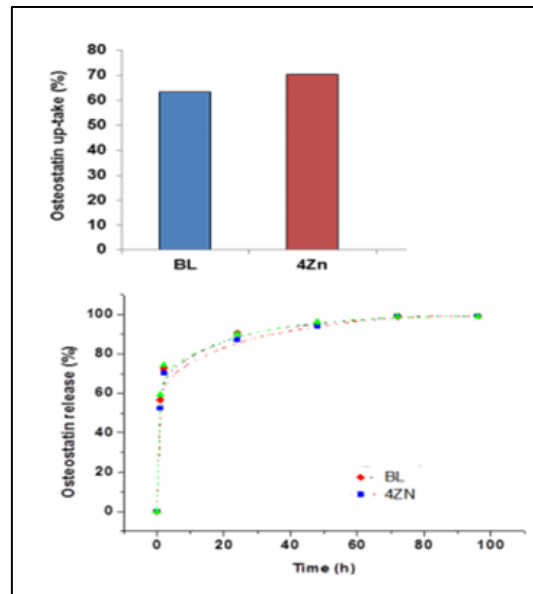


Fig 8. Porcentaje de liberación de osteostatina en el tiempo

Respecto a la elección definitiva de las MSCBM de Lonza, realizamos un estudio para confirmar su biocompatibilidad al observarlas con microscopio electrónico, viendo que presentaban su típica morfología fusiforme y estaban adecuadamente esparcidas sobre la superficie del andamio (figura 9).

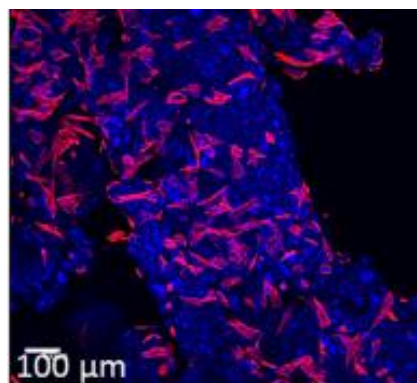


Fig 9. MSCBM cultivadas en los andamios a los 4 días observadas con microscopía de barrido láser confocal. Se realizó la tinción de los microfilamentos de F-actina para visualizar el citoesqueleto

4.2 Elección del animal

Seleccionar un modelo animal adecuado para crear un defecto óseo implica elegir aquel que refleje la biomecánica y la fisiología como ocurriría en el mismo escenario en humanos asumiendo las limitaciones existentes. Debemos tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- La analogía entre el modelo a utilizar y el sistema a investigar.
- La homogeneidad genética del animal para garantizar la reproducibilidad de los resultados.
- Aspectos de disponibilidad, coste y facilidad de manipulación experimental.
- Aspectos éticos relacionados con el uso de animales que impliquen la utilización de la menor cantidad posible garantizando el mínimo sufrimiento.

Teniendo en cuenta estas premisas y cumpliendo los requisitos que se establecen en la orden ECC/566/2015 y sus actualizaciones, por la que se establecen los requisitos de capacitación y funciones para el cuidado de los animales, eutanasia, realización de procedimientos y diseño de proyectos para todas las especies del anexo II de dicha ley, consideramos que el conejo era el modelo ideal.

El conejo tiene un sistema haversiano en el hueso trabecular semejante al nuestro, cuyo recambio óseo es entre 2 y 3 veces más rápido que el humano, lo que permite analizar cambios importantes en tiempos más cortos de estudio (Mills y Simpson, 2012). Su tamaño hace que la cirugía sea algo más sencilla que en roedores sin complicar su alojamiento, estabulación y cuidados. La rata, sin embargo, además de un manejo quirúrgico más limitado para grandes defectos óseos, tiene menor cantidad de hueso cortical y su estructura tiene una separación entre trabéculas muy pequeña, lo que no la hace apta para valorar los efectos de biomateriales activos (Park et al, 1999). Aunque para defectos críticos los animales grandes como el perro y la oveja han demostrado ser superiores a los animales más pequeños por su semejanza en cuanto a grosor y separación trabecular, presentan el problema del coste y la estabulación.

En este proyecto se utilizaron conejos hembras adultas ex-reproductoras de aproximadamente 4-5 kg de peso (\pm 500 g), de raza “Conejo gigante de Nueva Zelanda” y más de 18 semanas (figura 10). La elección de la edad adulta pero no avanzada se debe a la relación demostrada entre la misma y una disminución de la calidad ósea, con una menor tasa de reparación además de menor capacidad celular de proliferación y mitosis. La elección de hembras se debe a su manejo más fácil por su menor agresividad y la posibilidad de tener que albergarlas en corrales, aunque finalmente se pudo realizar en todas ellas un cuidado en jaulas individuales. La densidad mineral ósea y el crecimiento endocranal se encuentran claramente disminuidos durante los ciclos de reproducción y postparto, de ahí la elección de hembras ya reproducidas.



Fig 10. Conejos hembra en proceso de transporte desde jaulas hasta el quirófano experimental

En el proyecto se siguieron las normas de la Propuesta Europea (junio de 2010) de protección animal, modificación de la Directiva Europea de 1986 (63/2010/UE, España RD 53/2013). Aprobado por el Comité de ética de experimentación animal y siguiendo las normas de transporte, reglamento CE 1/2005, RD 751/2006; de alojamiento, convenio ETS 123 Del Consejo de Europa (recomendación 2007/526/CE); de bienestar animal, anexo II y III; sanidad, ley 8/2003; y sacrificio, reglamento CE 1009/2009 y de capacitación y formación del personal con las funciones B, C y D en el centro registrado del Hospital Universitario Doce de Octubre.

4.3 Elección del defecto óseo

Una vez decidido el animal, raza y tamaño, necesitábamos definir el defecto óseo a realizar y en qué hueso.

La definición de defecto óseo crítico en un modelo animal es la de aquel defecto en el que la cantidad de pérdida ósea no consolidaría ni se repararía en la vida de ese animal. Hollinger and Kleinschmidt lo definieron como un defecto con menos del diez por ciento de regeneración ósea (Hollinger y Kleinschmidt, 1990). El primer modelo propuesto en 1934 por Key, hipótesis de Key, lo describe como el defecto que supone la pérdida de un segmento óseo de tamaño 1.5 veces mayor al diámetro del hueso donde se produce (Ford y Key, 1956). Por consenso y tras múltiples estudios se han definido los defectos críticos en algunas especies animales experimentales siendo su tamaño de 25 a 30 milímetros en la oveja, de 21 a 30 milímetros en el perro y en el conejo 15 milímetros tanto en el radio como en el cúbito y la tibia. Menos clara está aún la medida en el gato y el ratón.

La elección de la pata delantera para realizar el defecto a nivel de la sinostosis radiocubital, se realizó planteando el problema de la estabilidad ósea. La manera de fijar el defecto nos llevó a elegir esta región por dos motivos. El radio y el cúbito, con sus dos articulaciones proximal y distal, forman un anillo estabilizado y reforzado con la membrana interósea dispuesta entre ellos. En humanos esta disposición permite el movimiento de pronosupinación, y para que esta unidad se altere, el anillo debe romperse en dos puntos. En el conejo el movimiento de pronosupinación no existe, al poseer una sinostosis natural radiocubital, por lo que esa estabilidad como unidad incluso se vería aumentada, motivo por el que la elección se realizó pensando en esta región como una unidad estable evitando así la necesidad de fijación con dispositivos externos, placas o yesos. La fijación con agujas, aunque realizada en las pruebas preliminares como se puede apreciar en la figura 11, fue descartada por su posibilidad de migración e infección además de por el daño que producía su paso por el material.

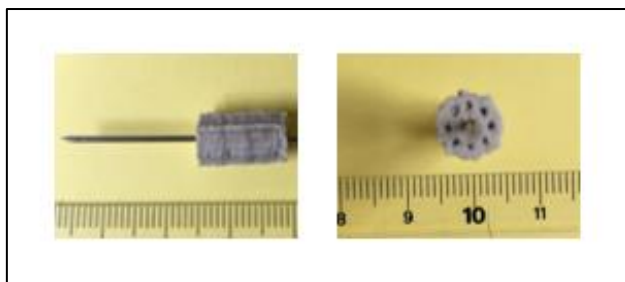


Fig 11. Pruebas de fijación de la biocerámica.

El fijador externo, además de poder producir fracturas suponía un estrés añadido para el animal permitiendo igualmente micromovimientos e inestabilidad con la carga. El yeso, a pesar de ser menos invasivo, se descartó dada la frecuencia de casos por parte del animal de morderlo y comerlo hasta su retirada.

Entre ambos huesos, la elección fue la de realizar de forma preferente el defecto en el cúbito por su fácil acceso y su disposición, más recta. El radio presenta dos curvas, supinadora y pronadora, que podrían complicar la introducción de forma estable de nuestro material. Esta elección, quedaba supeditada a la presencia de la variante anatómica que encontramos en estos animales, la sinostosis, donde el límite entre un hueso y otro no es homogéneo en todos ellos.

La realización del defecto se creó mediante una osteotomía diafisaria con una sierra oscilante y sustracción de 15 milímetros tras medición directa. Cuando se realiza una osteotomía, el defecto realizado es más preciso y controlado que si se realiza una fractura manual, con sierra de guillotina o impacto, en cuyo caso existirá más inestabilidad tanto por la separación ósea como por la afectación de partes blandas. Ambas técnicas, osteotomía y fractura cerrada, fueron comparadas por Park (Park et al, 1999) encontrando un retraso de consolidación, disminución del hematoma y mayor daño perióstico en el segundo caso. Por tanto, la técnica de osteotomía abierta y sustracción del defecto nos permitía además de la visualización directa del hueso para la toma exacta de medidas, un mejor control sobre los tejidos circundantes y mejor alineación de los fragmentos y estabilización ósea tras introducir la cerámica (figura 12).



Fig 12. Realización de defecto mediante osteotomía con sierra y sustracción ósea

4.4 Instalaciones

El animalario donde se realizó toda la parte experimental se encuentra en la planta baja del edificio de docencia e investigación del Hospital Universitario Doce de Octubre. Esta situación le confiere el aislamiento del resto del complejo hospitalario, así como un eficaz control sobre las entradas y salidas de material y personas que son independientes y propias. De su mantenimiento se encarga el servicio técnico integrado en la plantilla orgánica del hospital y, en casos especiales, empresas especializadas ajenas al mismo.

El número de habitaciones disponibles permiten alojar de forma separada las distintas especies que habitualmente se emplean (ratas, conejos y cerdos), y destinar una de ellas para establecer cuarentenas en animales de nueva recepción u observaciones especiales. Dichas habitaciones están revestidas por pinturas plásticas en techos y paredes, así como suelos antideslizantes impermeables en PVC con juntas soldadas que permiten limpiezas regulares con productos adecuados. Las puertas con acabado en acero inoxidable y tensor de cierre poseen juntas de estanqueidad perimetral y óculo con contraventana también en acero. Las ventanas están protegidas con telas metálicas de malla fina para evitar el paso de otros animales, principalmente, de insectos.

El área quirúrgica cumple con los requerimientos de la normativa vigente. Está separada del estabulario, cuenta con vestuarios de doble acceso, un antequirófano común y dos quirófanos uno preparado con dos dobles tomas de gases para dos mesas (con oxígeno, protóxido, aire medicinal y aspiración centralizada), preinstalación de brazo quirúrgico, equipos anestésicos y respiradores, pulsioxímetro, bombas de infusión, monitores, bisturí eléctrico, medidor de flujos con sondas y otros dispositivos quirúrgicos y anestésicos como respiradores para roedores y aparato de RX.

El instrumental se esteriliza y se lleva a un almacén de quirófano que se encuentra en comunicación con ambas salas. La limpieza de utensilios, jaulas, rejillas y biberones se efectúa en una zona específica y equipada con una máquina de lavado. Los cadáveres de animales muertos o sacrificados son congelados hasta su retirada por parte del Servicio Municipal de recogida de animales en una nevera que se encuentra fuera de las salas quirúrgicas.

Respecto a las condiciones ambientales, el tratamiento del aire se realiza con climatizadores y cajas terminales controlados desde una central informatizada que permite regular la temperatura y humedad de forma diferenciada, con renovaciones según locales y áreas, y presiones diferenciales (hasta 10 pascales en quirófanos y sobrepresión en la zona de barrera del animalario). La filtración del aire tiene dos niveles (filtros tipo G-4 y F-9) y un nivel en la salida del aire en el área específica del animalario. En quirófanos además hay un tercer nivel (F-6) y un filtro absoluto HEPA H-14 en los difusores. Existen reguladores luminosos para ciclos día-noche con controladores individuales en cuadro eléctrico específico. El aislamiento acústico dada la localización y construcción es suficiente para no ser causa de molestia en los animales alojados. Respecto al cuidado de los mismos, las condiciones de salud y alojamiento son verificadas por una veterinaria (Dra. Montserrat Grau Sanz).

Las jaulas donde alojábamos a los conejos, con unas dimensiones de 730 x 730 mm, presentaban las siguientes características:

- Bandejas de recogida de excrementos en acero inoxidable.
- Comederos-tolvas de acero inoxidable AISI 304.

- Soportes para biberón completos con biberón de 750 ml de policarbonato, aro de silicona y tetina de acero inoxidable con cánula cierre a bola.

Los alimentos se proporcionaban secos (piensos granulados) y específicos si así lo necesitaban con formulación adecuada para su especie, conocida y certificada. El agua procede de la red pública y como medida complementaria es acidificada (pH 3) o esterilizada en autoclave. Como cama se emplea viruta comercial de gran absorbencia que se acompaña periódicamente de un análisis químico y biológico. Aunque es infrecuente su empleo, existe una zona acotada exterior que posibilitaría el ejercicio de los animales en caso de largas estancias.

El personal asignado al animalario es estable y está entrenado en el manejo y cuidado de los animales, siendo su labor dirigida y supervisada por la veterinaria encargada.

Los animales nuevos se recibían en la fecha pactada para su recepción, inspección y verificación del estado de salud, estableciendo cuarentenas y días de aclimatación antes de ser utilizados en experimentos. Para garantizar la calidad zoosanitaria, la procedencia de animales es siempre de centros de cría y suministradores registrados. En nuestro caso, la Granja San Bernardo, que trabaja conforme a estándares de calidad reconocidos internacionalmente, según normativa ISO y con la acreditación de la Asociación Internacional para la evaluación y acreditación del cuidado de animales de laboratorio (AAALAC) concedida desde el año 2006.

Tras la elección del animal, el transporte se realizó en cinco envíos previa elección de fechas, con cajas de tamaño grande y transporte climatizado (figura 13).



Fig 13. Cajas de transporte del animal

Registro

Datos del centro como centro usuario de animales de experimentación Hospital Universitario 12 de Octubre. Número de Registro: ES28079000116.

4.5 Protocolo anestésico

Después de al menos 24 horas de aclimatación en las instalaciones, y tras pesar a los ejemplares, se inicia la etapa quirúrgica comenzando con el protocolo anestésico.

El protocolo se inicia con sedación preanestésica, beneficiosa para reducir las dosis de anestésicos generales y minimizar el estrés posterior en los animales. Para ello, se administra vía intramuscular ketamina (4 mg/kg), xylacina (25 mg/kg) y atropina (1 mg/kg), a dosis ajustadas según el peso del animal. Una vez sedado se procede a la preparación y rasurado de las zonas de intervención; la oreja, donde se coloca un catéter en la vena marginal para la medicación y la pata, zona a intervenir.

El marcaje del animal se realiza con la introducción de un microchip utilizando el dispositivo Lector Avid Minitracker 3 o, en caso de tenerlo, empleando el número tatuado en la oreja que traen desde la granja como se puede apreciar en la imagen de la figura 14.



Fig 14. Clasificación de animales: tatuaje en oreja vs lector microchip Avid

Para el inicio de la cirugía y añadida a la sedación inicial, se empleó ketamina con dosis de 1-1.5 mgr y halotano al 3-4% de mantenimiento con mascarilla (figura 15). Las intervenciones se llevaron a cabo bajo profilaxis antibiótica mediante cefazolina intravenosa (50 mg/kg), en dos dosis. La primera se administró tras la inducción anestésica y la segunda transcurridas 12 horas. Para el tratamiento del dolor se empleó meloxicam 5 mg/ml.

Durante todo el procedimiento, la monitorización básica de las variables fisiológicas se realizó vigilando la frecuencia del pulso periférico y la frecuencia respiratoria, además de controlar la saturación a través de un pulsioxímetro colocado en la oreja del animal. Para minimizar el dolor y el estrés postquirúrgico y conseguir una rápida recuperación se administró buprenorfina intravenosa a dosis de 0,01 mg/kg.



Fig 15. Conejo anestesiado con mascarilla de mantenimiento y pata rasurada

Antes y después de la intervención también se evaluaron otras variables como la temperatura o la ingesta, más importantes en los días posteriores postoperatorios para descartar cualquier complicación.

Para el sacrificio se empleó el método de la sobredosis anestésica. Para una sedación inicial las dosis equivalentes dado el peso de los animales equivalían a 1.5 mL de equipromacina y 2 mL de tiopental diluido en 100 mL de suero. Se inyectaron lentamente, con intervalo de tiempo entre

ellos hasta producirse la parada cardiorrespiratoria y conseguir una muerte sin sufrimiento y cumpliendo las normas de la Legislación aplicable: RD 53/2013.

4.6 Protocolo quirúrgico

31 conejos fueron intervenidos mediante el siguiente protocolo quirúrgico y cumpliendo con las máximas condiciones de esterilidad.

El biomaterial que se iba a emplear en cada día quirúrgico se recibía la misma mañana de la intervención y se guardaba en neveras hasta su implantación. La impregnación de osteostatina se realizaba 24 horas antes de la cirugía (figura 16). Hasta el momento del transporte, las piezas se conservaban en una estufa de CO₂ y con luz UV.



Fig 16. Piezas de biocerámica sumergidas en solución PBS, impregnadas en osteostatina y colonizadas por MSC

La elección de la pata delantera derecha o izquierda se realizó de forma aleatoria.

Tras la preparación de la zona quirúrgica con rasurado con maquinilla eléctrica y la preparación del campo estéril (figuras 17 y 18), realizamos un abordaje directo sobre el tercio medio de la pata delantera, preferentemente a nivel cubital y provocando un defecto óseo mediante osteotomía y sustracción de 15 mm a nivel del tercio medio diafisario (figuras 19 y 21).



Fig 17. Elección y preparación de la pata. Desinfección con povidona yodada

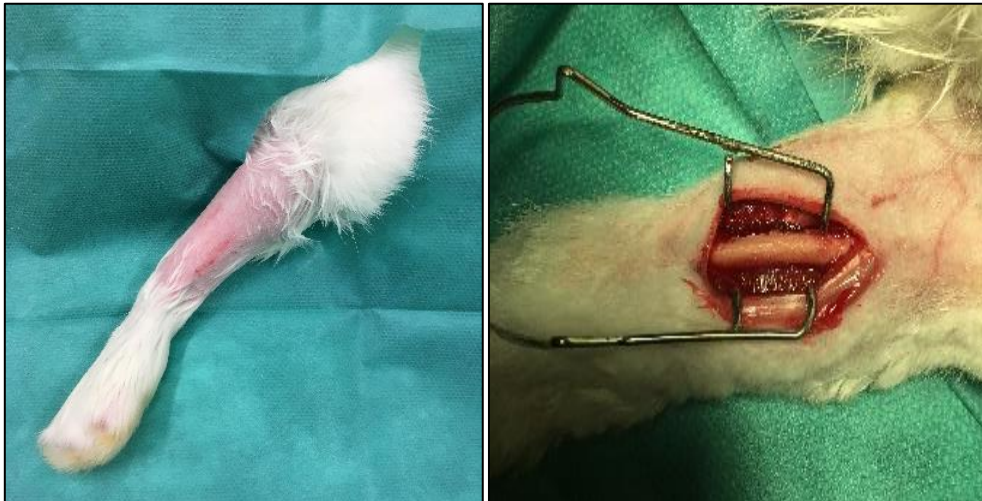


Fig 18. Preparación de campo estéril. Fig 19. Abordaje directo sobre cúbito tras disección por planos

La osteotomía la realizamos con una sierra oscilante y separadores automáticos para evitar el daño sobre las partes blandas circundantes. Previamente tomábamos las medidas del tamaño elegido para crear el defecto (figuras 20, 22 y 23).



Fig 20. Mediciones para la creación del defecto óseo

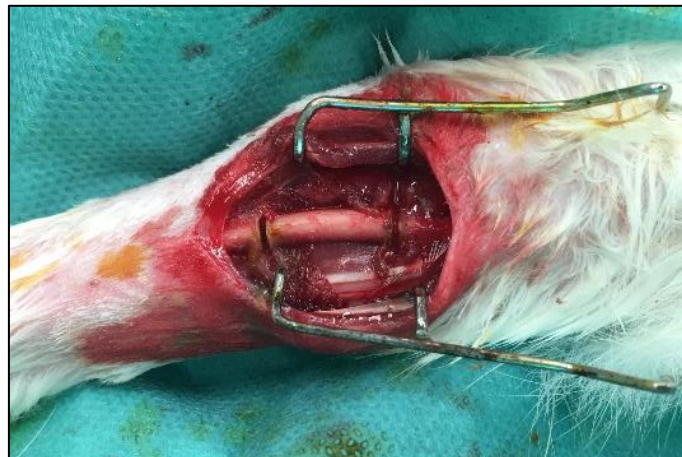


Fig 21. Osteotomía con sierra oscilante y escoplos

Tras la extracción se realizaba un lavado abundante con suero fisiológico y povidona yodada para la implantación del material correspondiente según el grupo asignado (figura 24). Posteriormente, y tras la comprobación de la estabilidad, se realizaba el cierre por planos, con Vycril de 3.0 para el tejido subcutáneo y con sutura monofilamento no reabsorbible en la piel (figuras 25 y 26).

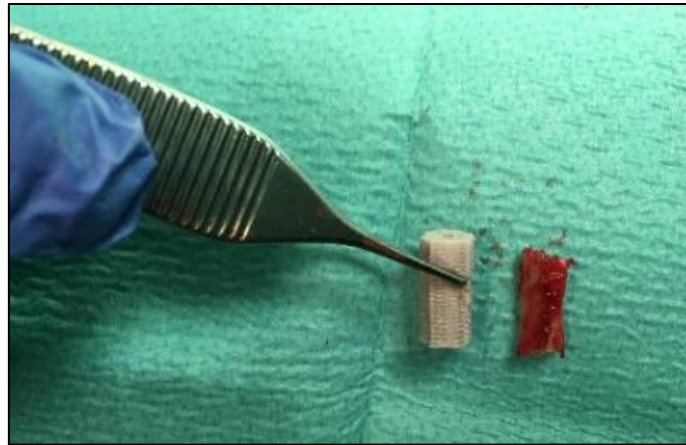


Fig 22. Extracción del fragmento de cúbito de 15x6.5mm

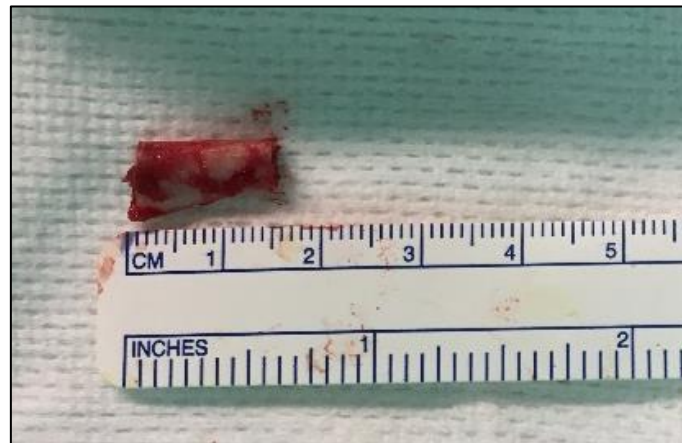


Fig 23. Medición del fragmento de cúbito



Fig 24. Implantación de la biocerámica en defecto diafisario



Fig 25. Cierre por planos, tejido subcutáneo



Fig 26. Cierre de piel

Tras la intervención, los animales permanecían en observación y después eran trasladados a sus jaulas para el seguimiento correspondiente durante 6 o 12 semanas, plazos en los que se vigilaba su evolución, cambios de comportamiento y posibles complicaciones.

Cada uno de ellos estaba identificado por número de chip o tatuaje, pata intervenida, material implantado y fecha de la cirugía como se muestra en la figura 27.

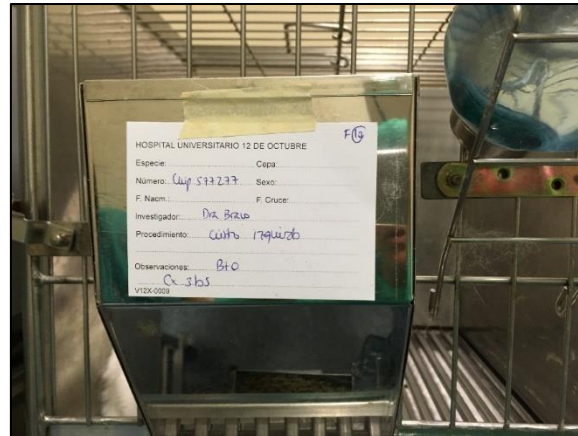


Fig 27. Jaula con detalle de animal: chip, grupo y lateralidad

Tras cumplir el seguimiento, se realizaba el sacrificio según la técnica anestésica detallada previamente y se procedía a la extracción de la pata y preparación de la muestra para su conservación en el congelador (figuras 28 y 29). El cuerpo del animal se envolvía una vez retirada la vía para introducirlo en la nevera hasta la recogida por parte del servicio de mortuorio.



Fig. 28. Cúbito diseccionado con defecto en su parte media diafisaria

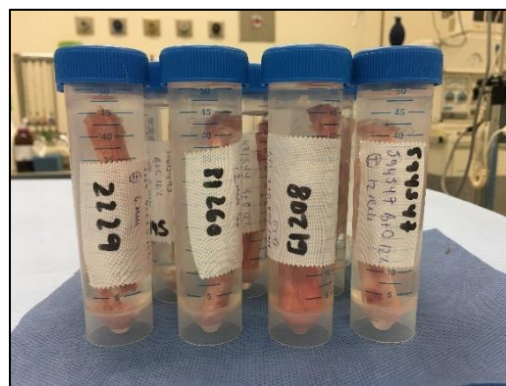


Fig 29. Preparación de piezas y almacenamiento para su análisis

4.7 Grupos experimentales

Se crearon tres grupos experimentales:

- Grupo B+O: biocerámica y osteostatina
- Grupo B+C: biocerámica y células
- Grupo B+C+O: biocerámica, células y osteostatina

Cada uno de los grupos contaba al menos con nueve conejos inicialmente divididos en dos tiempos de seguimiento, 6 y 12 semanas. Y cada uno de los tiempos, tenía asignado un control con biocerámica sin señales ni células añadidas (B control).

La inclusión de cada animal en su grupo correspondiente se realizó de forma aleatoria al igual que el tiempo asignado de seguimiento.

4.8 Análisis histológico

Tras la toma de muestras óseas una vez sacrificados los animales de experimentación, éstas continuaban conservadas en etanol de 96° para su fijación y conservación. Al tratarse de muestras óseas no descalcificadas, fueron lavadas con agua y serradas para delimitar macroscópicamente las zonas de la lesión. Posteriormente, las piezas fueron deshidratadas mediante inmersión en soluciones de etanol de gradación creciente (70°, 80°, 90° y 95°), estando embebidas durante 24 horas en cada una de las disoluciones hasta llegar a etanol absoluto, donde permanecieron 2 días. A continuación, las muestras fueron incluidas en metilmetacrilato líquido durante 15 días a 4°C en agitación. De forma paralela, se prepararon los cilindros de vidrio con base de metilmetacrilato polimerizado que se usaron como soporte para la posterior inclusión de las muestras óseas. Para ello, tras los 15 días de inclusión, las piezas óseas fueron transferidas a los cilindros de vidrio recubriéndolas de nuevo con metilmetacrilato líquido. Los tubos fueron sellados con parafilm y mantenidos en estufa a 32° C durante 5-6 días hasta su polimerización. Seguidamente, el bloque polimerizado con la muestra ósea fue cortado con el micrótopo (Microm HM 350S). Los primeros cortes se realizaron con un grosor de 30 µm hasta llegar a la zona de la lesión donde se

realizaron cortes de 5µm que fueron colocados sobre portaobjetos gelatinizados recubiertos con film de polietileno y prensados y secados a 60° C durante 24 horas.

Para la realización de las tinciones histológicas, los cortes fueron desplastificados mediante inmersión en metil-acetato durante 55 minutos. Posteriormente, se lavaron en soluciones decrecientes de alcohol hasta agua destilada. Los protocolos de tinción empleados fueron Tricrómico de Goldner y Von Kossa, que permiten distinguir el osteoide del hueso calcificado, así como la morfología y distribución de las células en el tejido. La interpretación de estas dos tinciones se resume en que la tinción de Tricrómico de Goldner en hueso mineralizado adquiere coloración azul y la matriz ósea sin calcificar, el osteoide, en rojo. Mientras que en la tinción de Von Kossa, el hueso mineralizado adquiere una coloración negra.

Protocolos de tinción

○ Tricrómico de Goldner:

Pasos protocolo de tinción	Componentes
Hematoxilina férrica de Weigert 5´	Weigert A (concentrada x 2): Hematoxilina (2gr) + Alcohol 96° (100mL)
	Weigert B: Percloruro de hierro (1,16gr)
HCl (10 mL) + Agua destilada (5mL): 1mL	
Agua destilada 98mL	
Mezclar a partes iguales las soluciones A y B sólo antes de su uso	
Agua corriente 10´	
Ponceau de xilidina 40´	200 mL agua destilada + 2 gr Ponceau de xilidina + 0,4 mL ácido acético glacial + 1 gr fucsina ácida
Lavado rápido en ácido acético al 1%	
Lavado rápido en agua destilada	
Diferenciar en ácido fosfotungstico-Orange G 10´	200 mL agua destilada + 2 gr ácido fosfotungstico + 1 gr orange G
Lavado rápido en ácido acético al 1%	
Lavado rápido en agua destilada	
Verde luz 15´	200 mL agua destilada + 0,4 gr verde luz + 0,4 mL ácido acético glacial
Lavado rápido en ácido acético al 1%	
Lavado rápido en agua destilada	
Deshidratar y montar	

○ Von Kossa:

Pasos protocolo de tinción	Componentes
Nitrato de plata al 3%, 5 minutos	
Agua destilada x 2 veces, 5 minutos	
Formol-carbonato de sodio, 5 minutos	10 mg de carbonato de sodio + 150 mL de agua destilada + 50 mL de formaldehído al 37%
Agua corriente 10 minutos	
Sulfato de sodio al 5%, 5 minutos	
Agua corriente, 10 minutos	
Ponceau de xilidina 45 minutos	
Lavado rápido en ácido acético al 1%	
Lavado rápido en agua destilada	
Diferenciar en ácido fosfotúngstico-Orange G 15 minutos	
Lavado rápido en ácido acético al 1%	
Lavado rápido en agua destilada	
Deshidratar y montar	

Las imágenes microscópicas de las muestras histológicas se captaron utilizando una máquina fotográfica Nikon digital Sight DS-smc acoplada a un microscopio óptico Nikon eclipse 90i, y digitalizadas directamente por un programa capturador de imágenes MetaMorph Meta Imaging Series 6.1.

4.9 Análisis de imagen

Inicialmente se realizaron en las primeras intervenciones radiografías como control postoperatorio para valorar el material implantado y vigilar la aparición de fracturas o desplazamientos secundarios.

El aparato utilizado en el experimental era un modelo CCX digital de ortopantomografía, que necesitaba para su revelado placas kodak RX io-41 insight oclusales (figuras 30 y 31). Tras el revelado de las primeras piezas, el aparato se estropeó así que optamos por la solución de realizar la radiografía tras el sacrificio, antes de la imagen de micro-TC en el mismo laboratorio de imagen donde íbamos a realizar ese estudio.

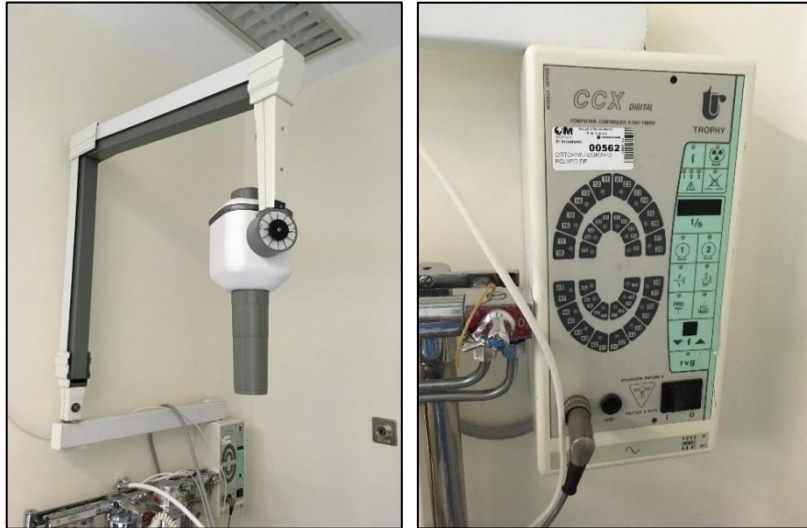


Fig 30 y 31. Aparato de rayos de ortopantomografía CCX digital.

A continuación, pueden ver algunas de esas primeras imágenes radiológicas realizadas (figuras 32 y 33).

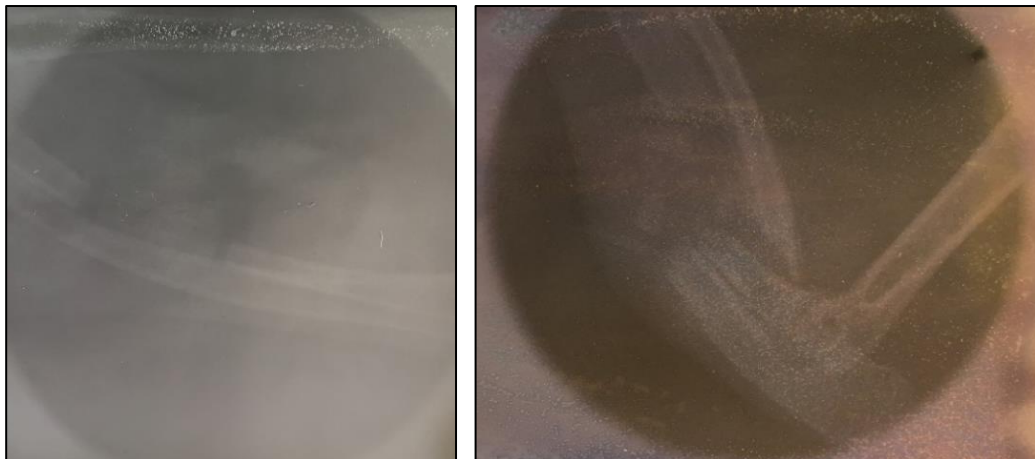


Fig 32. Control del defecto y biocerámica implantada. Fig 33. Fractura de radio y cúbito

El revelado de estas imágenes iniciales lo realizamos de forma manual en una sala del centro experimental con líquido revelador y fijador.

Una vez sacrificados y extraída la pata, los especímenes se almacenaban en congelador. Para su traslado se procedía a realizar un protocolo que consistía en la descongelación durante 24 horas y mantenimiento de la pata en alcohol de 96° para la fijación necesaria en el posterior estudio histológico. El protocolo incluía un cambio de alcohol diario durante la primera semana y posteriormente una vez cada cinco días.

Las piezas se trasladaron al Laboratorio de imagen del Hospital Universitario Gregorio Marañón para la adquisición de las imágenes de los huesos con el escáner de pequeño animal SuperArgus (Sedecal). Realizar el análisis estructural sin necesidad de destruir la muestra era necesario porque después teníamos que realizar el estudio histológico. En la bibliografía se describen métodos de análisis 2D y 3D de estas imágenes para hueso trabecular (Hildebrandt et al, 1999), basados en modelos para la microestructura del hueso de plates o rods (Feldcamp et al, 2009). Estos modelos establecen fórmulas que relacionan los parámetros trabeculares (número, grosor y separación de las trabéculas) con la superficie y el volumen ocupado por el tejido óseo y el volumen total de la muestra. En cuanto al software comercial, encontramos dos opciones: 3D Suite, comercializado por Bruker y VivaCT40, comercializado por Scanco. Estos paquetes software están desarrollados para los equipos de rayos X comercializados por dichas compañías no permitiendo adaptaciones a formatos de imagen diferentes, y son cerrados, dificultando la incorporación de nuevas medidas que puedan ser necesarias en un experimento concreto. Por ello, para el estudio de las imágenes finalmente diseñamos un software con la colaboración del equipo del Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón y el departamento de Bioingeniería e Ingeniería Aeroespacial de la Universidad Carlos III de Madrid. El objetivo era crear un sistema para la cuantificación del tejido óseo, integrada en una herramienta software diseñada para seguir un enfoque modular con el fin de permitir flexibilidad para añadir nuevas funcionalidades.

Todas las muestras fueron escaneadas con un voltaje de 65 kV y una corriente de 600 μ A, cubriendo 360 grados con un total de 720 proyecciones. El tamaño de pixel en proyección fue de 0.075 mm y el tamaño de vóxel en reconstrucción de 0.058 mm isotrópico.

Analizamos las características del hueso neoformado mediante distintas variables (Bouxsein et al, 2010):

- Volumen de hueso en el área a estudio: BV/TV

Volumen de hueso/volumen total del área de interés.

Para el cálculo del aumento de volumen de hueso medíamos:

1. El cociente entre el volumen de hueso y el volumen total en toda la zona del defecto (BV/TV).
2. El cociente entre la superficie de hueso y superficie total en un corte axial representativo de la regeneración de hueso (BS/TS).

La segmentación de hueso se hacía por umbralización asegurando la elección de un umbral que seleccionase sólo el hueso trabecular y cortical formados.

- Estudio trabecular

Para el estudio trabecular se calculaban tres valores:

- El grosor trabecular (Tb.Th, trabecular thickness).
- El número trabecular (Tb.N, trabecular number).
- La separación trabecular (Tb.Sp, trabecular separation).

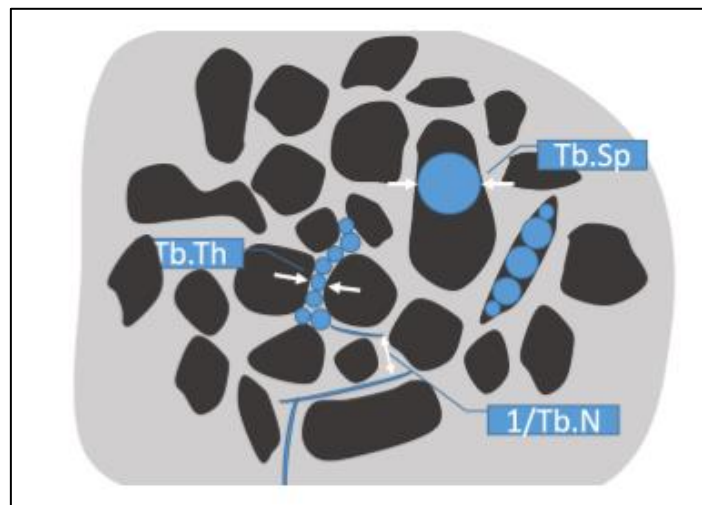


Fig 34. Representación esquemática de los parámetros del estudio trabecular. Hueso representado en gris

En la figura 34 se expone una representación esquemática de los mismos.

Estos parámetros se calculan en una ROI que sólo contenga hueso trabecular, tras la segmentación del hueso por umbralización. Para facilitar la umbralización, se hace un realce de los bordes del hueso con un paso de “unsharp masking”.

El cálculo de los parámetros se expone en la tabla 2.

Tabla 2. Estudio trabecular.

	Fórmula	Datos
Grosor trabecular (Tb.Th)	$Tb.Th = 2 BP/BV$	BP (bone perimeter) perímetro de hueso trabecular, suma de todos los píxeles con valor 1 de la imagen calculada a partir de la resta de la imagen dilatada con un elemento estructurante y de la imagen segmentada BV (bone volume)
Nº trabecular (Tb.N)	$Tb.N = (BV TV) / Tb.Th$	Nº de trabéculas por unidad de longitud (unidades de mm-1)
Separación trabecular (Tb.Sp)	$Tb.Sp = 1/Tb.N - Tb.Th$	Diámetro de las cavidades que contienen médula ósea

○ Estudio cortical

El grosor cortical producido en los bordes del defecto, área de estudio, se calcula como la anchura del perfil a la mitad del máximo (FWHM) en un perfil en esa región que contenga sólo hueso cortical (línea azul discontinua en la figura 35). Como dentro del hueso los valores son superiores a los de fuera, ajustamos la curva a trazos a un perfil simétrico (línea sólida azul). Tras normalizar el perfil, el FWHM se calcula como se muestra en la figura 35.

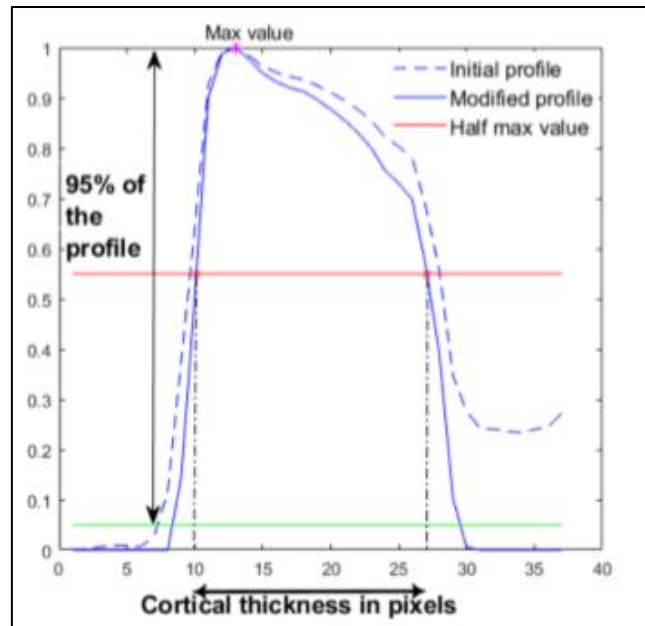


Fig 35. Grosor cortical en un extremo del defecto creado

En cada extremo del defecto se calculaban los siguientes valores:

- Ct.Ar (cortical bone area/cortical volumen, mm^2)
- Ct.Ar/Tt.Ar (cortical area fraction, %)
- Ct.Th (average cortical thickness, mm)

Todos los parámetros descritos previamente se integraron en una interfaz, BoneAnalytics, desarrollada en MATLAB siguiendo un enfoque modular y basada en la programación orientada a objetos.

BoneAnalytics se maneja a través de su interfaz gráfica de usuario. Como se muestra en la figura 36, la interfaz de usuario permite cargar un estudio de TAC en unidades Hounsfield y variar el nivel y ventana de las imágenes, así como seleccionar el número de corte en las distintas vistas arrastrando el ratón en cada imagen.

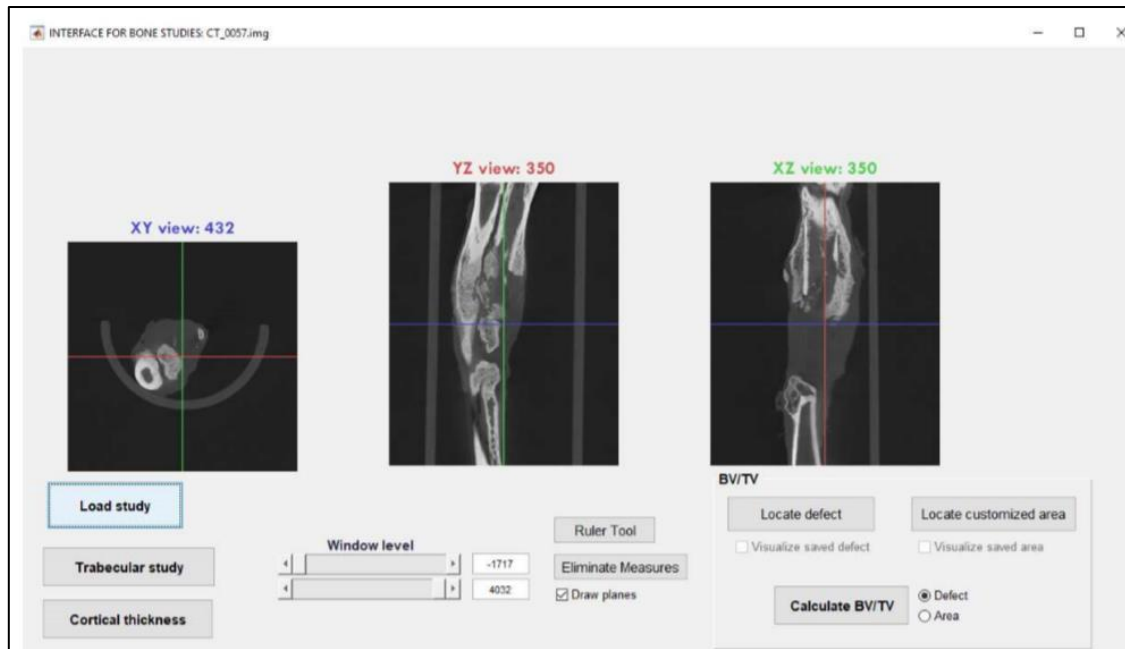


Fig 36. Interfaz de usuario

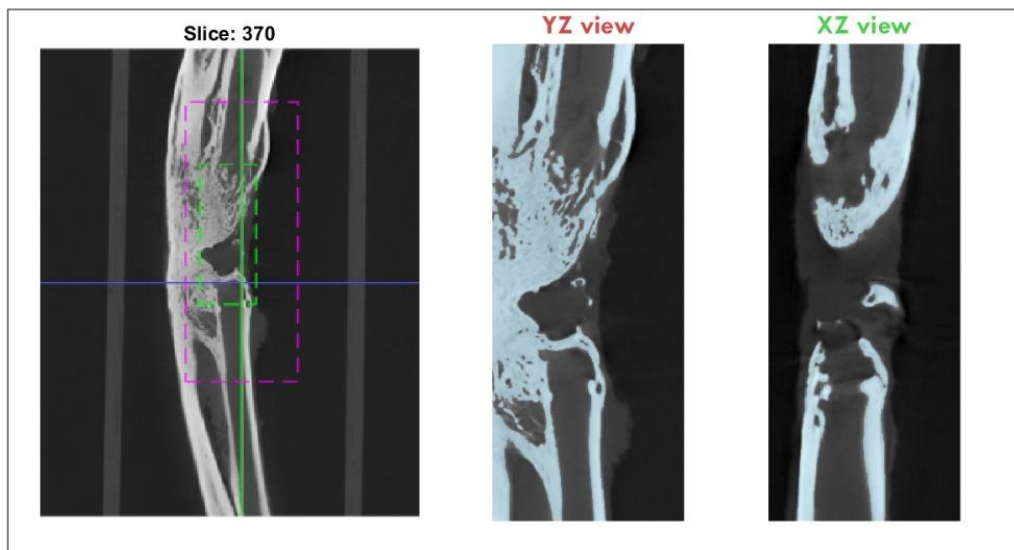


Fig 37. Localización del defecto. Para segmentar el hueso aparece una ventana en la que el usuario selecciona el umbral

Para el cálculo de la relación BV/TV se pueden seleccionar dos tipos de regiones de interés (ROIs), definidas por nosotros y que corresponden a los botones “Locate defect” y “Locate customized area”, siendo la región seleccionada en el segundo el doble de la del primero. La ROI

de la selección “Locate defect” tiene un tamaño igual que el tamaño del defecto creado en el cúbito del conejo, 15 milímetros. La de mayor tamaño, la realizamos para evitar errores de posición con la ROI inicial respecto al defecto y valorar si podía suponer algún sesgo en las mediciones (figura 37).

Para realizar el estudio trabecular, el usuario debe posicionar una ROI rectangular de tamaño variable en una región de hueso trabecular y seleccionar un umbral para segmentar el hueso (figura 38). Para facilitar la visualización de los bordes del hueso, la herramienta ofrece la opción del botón “sharpen”.

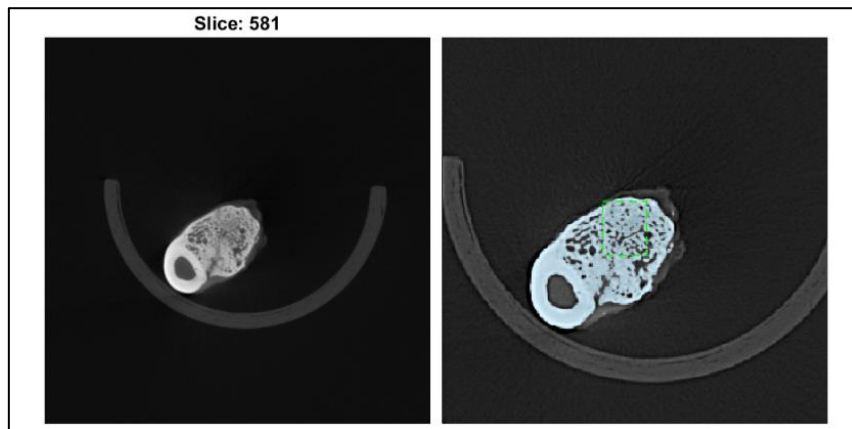


Fig 38. Corte para estudio trabecular. Selección de ROI y modo sharpen a la derecha

El estudio cortical se realizaba en ambos extremos del defecto creado seleccionando un perfil en el borde para medir el grosor del hueso cortical como se muestra en la figura 39. La medición calculaba una media de dos valores de grosor cortical en cada uno de los extremos para valorar así la respuesta ósea generada por el material implantado.

Una vez realizadas todas las medidas y dentro de cada carpeta de imagen de estudio, se generaba un archivo de Excel y se guardaban las imágenes de las distintas ROIs y segmentaciones realizadas. Cada medida, tiene un identificador (“id” y “study name”) que relaciona los valores con la imagen a partir de la cual se obtuvieron (tabla 3).

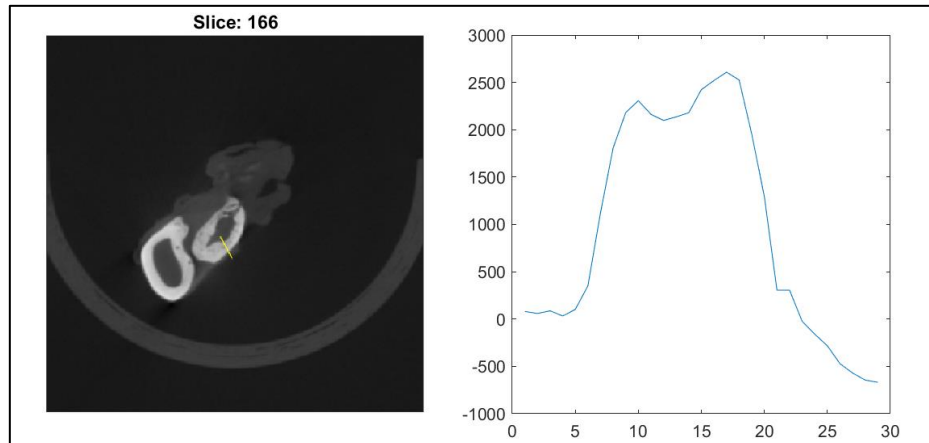


Fig 39. Estudio cortical en un extremo del defecto óseo creado

Tabla 3. Registro de estudio C13: CT 61208.

id	Study name	ROI position	ROI size -X Y	BV(px)	TV(px)	BV/TV	Threshold	Radio	ROI trabecul	ROI cortical	Tb.N	Tb.Th(mm)	Tb.Sep(mm)	Cortical.Th(n	Profile
0	CT_61208_id	581 110.5158	1	2200	2891	0,76098236	110,09376	3	175.5172	178.868	48	0,04260334	1,09059829	0,2707973	
1	CT_61208_id	652 113.1754	140.807	466.6667	466.6667					348.3509	359.4035	287.5614	366.1579		2,9770193 -935 -934 -917 -92
2	CT_61208_id	652 113.1754	140.807	466.6667	466.6667					349.5789	355.7193	395.6316	448.4386		1,42313273 -193 -182 -149 -11
3	CT_61208_id	412 151.2456	131.5965	466.6667	466.6667					301.6842	340.9825	327.4737	358.1754		1,58639386 -433 -333 -23 272
4	CT_61208_id	412 119.3158	125.4561	466.6667	466.6667					364.3158	387.6491	371.6842	392.5614		0,34945422 -30 -23 -38 -22
5	CT_61208_id	370 295.4759	3	1108615	2456296	0,45133608									
6	CT_61208_id	370 268.9517	2	3963858	8749280	0,45304962									

4.10 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico empleamos el programa SPSS en su versión 15.0. En las comparaciones de los parámetros óseos entre grupos empleamos el test no paramétrico de Kruskal Wallis para muestras independientes con el factor de corrección de Dunn. Para la comparación intragrupo entre los dos tiempos de seguimiento empleamos el test no paramétrico U de Mann Whitney. Valorábamos el efecto mediante la diferencia de medias y la precisión mediante el intervalo de confianza del 95%. En todos los casos, como grado de significación estadística se consideró un valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Las piezas analizadas en este proyecto fueron evaluadas macroscópicamente, histológicamente y con un análisis de imagen mediante radiografía y micro-TC.

A continuación, pasamos a detallar los resultados obtenidos.

5.1 Resultados macroscópicos

31 conejos fueron intervenidos registrando las incidencias quirúrgicas y los hallazgos macroscópicos tras el sacrificio. El registro se realizaba en una tabla de Excel (tabla 4), según su correspondencia con número de tatuaje o chip.

El número total de biocerámicas implantadas fue de 31. Once del grupo B+C, seis en el tiempo de seis semanas y cinco en el de doce. Nueve en el grupo B+O, con cinco con seguimiento de seis semanas y cuatro en el de doce semanas. Y nueve en el grupo B+C+O, con cuatro y cinco respectivamente.

Hubo seis pérdidas durante el seguimiento; ninguna de ellas en el postoperatorio inmediato. Dos por infección de la herida quirúrgica de los grupos B+C+O y B+C (seis semanas). Dos por fractura de radio y cúbito; una en el grupo B+C (seis semanas) y otra en el grupo B+C+O (doce semanas). Una muerte por un cuadro de inanición en el grupo B+O (seis semanas) que no mejoró tras tomar las medidas de tratamiento adecuadas para evitar el sufrimiento animal y mantener durante días nutrición enteral. Falleció tres días antes de cumplir su seguimiento por lo que decidimos analizar su resultado teniendo en cuenta su pérdida en la interpretación de los mismos. Y una muerte cuya causa fue desconocida en el grupo de B+O (seis semanas).

En las figuras 40 y 41 pueden ver casos con alguna de estas complicaciones.

Tabla 4. Registro quirúrgico

	Chip	Nº	Material	Pata	Incidencias cirugía	Observaciones	Semanas
C1		H1062	B+C	I	Sin incidencias	Completo Buena consistencia	6
C2	577639		B+C	D	Se rompe BC en 2	Parcial	12
C3	573807		B+C+O	D	Sin incidencias	Completo Buena consistencia	6
C4	577277		B+O	I	Sin incidencias	Parcial	12
C5			CONTROL	I	Sin incidencias	Sin relleno Fibrosis	12
C6		H61401	B+C+O	I	Tamaño defecto 18 mm	Completo Hipertrófico Fibrosis	12
C7		H81260	B+C+O	I	Sin incidencias	Relleno ideal Completo Resistente Homogéneo	12
C8	106580057		B+O	D	Sin incidencias	Parcial	6
C9		H51328	B+C+O	D	Tamaño defecto 18mm	Completo Consistencia media	12
C10	594547		B+O	I	Sin incidencias	Completo Buena consistencia	12
C11		H119	CONTROL	D	Sin incidencias	Sin relleno	6
C12		H60945	B+C	D	Sin incidencias	Completo Fibrosis	6
C13		H61208	B+C	D	Sin incidencias	Parcial	12
C14		H81143	B+O	I	Sin incidencias	Completo Buena consistencia Homogéneo	6
C15	900046000192222		B+O	I	Sin incidencias	Parcial Fibroso Movilidad del foco	12
C16	900046000192230		B+O	D	Sin incidencias	Parcial Fibrosis	6
C17	900046000192221		B+C	D	BC más pequeña que defecto	Completo Consistencia media	6
C18	900046000192224		B+C+O	D	Sin incidencias	Completo Fibrosis	6
C19	900046000192223		B+C	I	Sin incidencias	Completo Fibrosis	12
C20	900046000192226		B+C	I	BC más pequeña que defecto	Completo Fibrosis media	12
C21	900046000192227		B+C+O	D	Sin incidencias	Completo Consistencia media	12
C22	900046000192229		B+C+O	I	En sacrificio, granuloma	Parcial	6
C23		H71624	B+C	I	Sin incidencias	Completo Fibrosis	12
C24		H61074	B+O	I	Sin incidencias	Completo Fibrosis	12
C25		H31088	B+C	I	Sin incidencias	Completo Buena consistencia	6
C26		H71088	B+C	I	Sin incidencias	Infección + fractura Visto en sacrificio.	6
C27		H71431	B+C	I	Se rompe BC en 2	Sacrificado por fractura radio	
C28	567858		B+C+O	D		Sacrificado por fractura radio	
C29	591844		B+C+O	D		Sacrificado por infección	
C30	900046000192214		B+O	D	Sangrado/hemostasia	Hallado muerto	
C31		H71544	B+O	D		Inanición	5,5



Fig 40. Infección de la herida quirúrgica caso C26. Fig 41. Fractura de antebrazo caso C28

La distribución por grupos y tiempos de seguimiento tanto inicial como final una vez excluidos los casos de complicaciones se expone en las tablas 5 y 6.

Tabla 5. Distribución inicial de casos

DISTRIBUCIÓN INICIAL 31 conejos			
Grupo	6 semanas	12 semanas	Pérdidas
B+C	6	5	-1 infección -1 fractura
B+O	5	4	- 1 inanición -1 desconocida
B+C+O	4	5	-1 fractura -1 infección
Controles	1	1	

Tabla 6. Distribución final excluidas las pérdidas de seguimiento

DISTRIBUCIÓN FINAL 25 conejos			
Grupo	6 semanas	12 semanas	TOTAL
B+C	4	5	9
B+O	3	4	7
B+C+O	3	4	7
Controles	1	1	2

En el análisis macroscópico, observamos buenos resultados con defectos rellenos por completo con una consistencia dura o media en 10 casos y con algo más de fibrosis, pero también con una cobertura completa en otros 6 casos más.

En el grupo de B+C+O, 4 de los casos presentaban un relleno completo del defecto con buen aspecto, 3 de ellos con 12 semanas de seguimiento, C7, C9 y C21, y una con 6 semanas de seguimiento, C3. Esto ocurría de forma similar en dos de los casos de B+O, C10 y C14, con 6 y 2 semanas respectivamente de seguimiento y en cuatro del grupo B+C, C1, C17 y C25, de 6 semanas y C20, de 12 semanas. Estos defectos que considerábamos con buen resultado macroscópico por su relleno completo, se veían como los expuestos en las figuras 42 y 43, con una cobertura completa y un aspecto o consistencia homogéneos en todo el hueso.



Fig 42. Imagen macroscópica caso C21

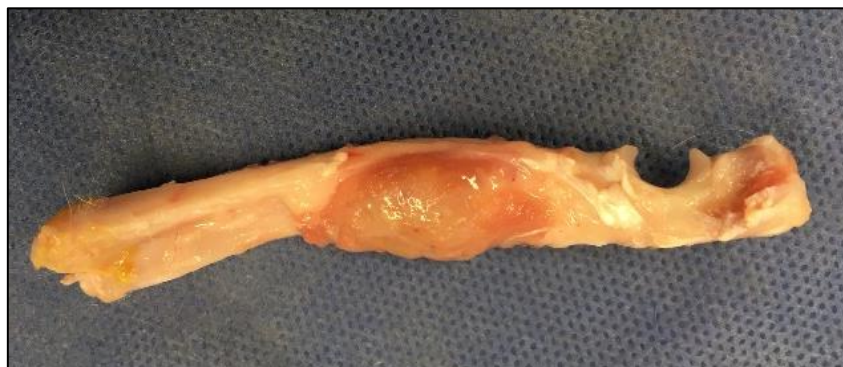


Fig 43. Imagen macroscópica caso C17

En el resto de casos, destaca un relleno completo pero fibroso en las piezas C6 y C18 del grupo B+C+O; C12, C19 y C23 del grupo B+C y C24 del grupo B+O.

La figura 44 representa una imagen perteneciente a esta descripción previa.



Fig 44. Imagen macroscópica caso C24

En 7 casos el resultado macroscópico no fue el esperado. Encontramos un relleno parcial del defecto con procesos de fibrosis y poca homogeneidad con el resto del tejido óseo en las piezas C2 y C13 del grupo B+C; C4, C8, C15 y C16 del grupo B+O y C22 del grupo B+C+O.

También encontramos este resultado en los dos controles, piezas C5 y C11, en estos casos como era de esperar.

Ejemplos de este último grupo se exponen en las figuras 45 y 46.



Fig 45. Relleno parcialmente cubierto con tejido fibroso, caso C15



Fig 46. Relleno parcialmente cubierto con tejido fibroso poco homogéneo, caso C16

En las tablas 7, 8 y 9 se representa de forma esquemática la clasificación de los resultados macroscópicos.

Tabla 7. Distribución de casos con relleno completo, buen aspecto y resistencia

Completo. Buen aspecto	
Caso	Material
C1	B+C
C17	B+C
C20	B+C
C25	B+C
C3	B+C+O
C7	B+C+O
C9	B+C+O
C21	B+C+O
C10	B+O
C14	B+O

Tabla 8. Distribución de casos con relleno completo y fibrosis

Completo. Fibrosis	
Caso	Material
C12	B+C
C19	B+C
C23	B+C
C6	B+C+O
C18	B+C+O
C24	B+O

Tabla 9. Casos con relleno parcial

Parcial	
Caso	Material
C2	B+C
C13	B+C
C22	B+C+O
C4	B+O
C8	B+O
C15	B+O
C16	B+O
C5	Control
C11	Control

Por tanto, y a modo de resumen, obtuvimos buenos resultados macroscópicos en 16 de los 23 casos (70%) excluyendo los controles, siendo este resultado más frecuente en los grupos de B+C+O y B+C.

5.2 Resultados del análisis histológico

El estudio histológico lo desarrollaremos a continuación en función del tiempo de seguimiento, 6 y 12 semanas, y material implantado.

5.2.1 Análisis detallado de las muestras

○ **Seguimiento de 6 semanas**

Grupo control: B (una única muestra)

En el grupo control de 6 semanas observamos un defecto óseo sin regenerar, que se encuentra totalmente ocupado por tejido de granulación. Hallamos grandes restos de material, delimitados por tejido conectivo organizado con la formación de una cápsula que los engloba de forma conjunta (figura 47). En su mayoría, los numerosos restos de material no han desencadenado reacción tisular, aparecen quiescentes (figura 48). No obstante, en la interfaz entre los restos y el

tejido conectivo que lo delimita, es donde encontramos una reacción celular de tipo inflamatorio, compuesta en su mayoría por numerosos macrófagos, fibroblastos y monocitos (figura 49).

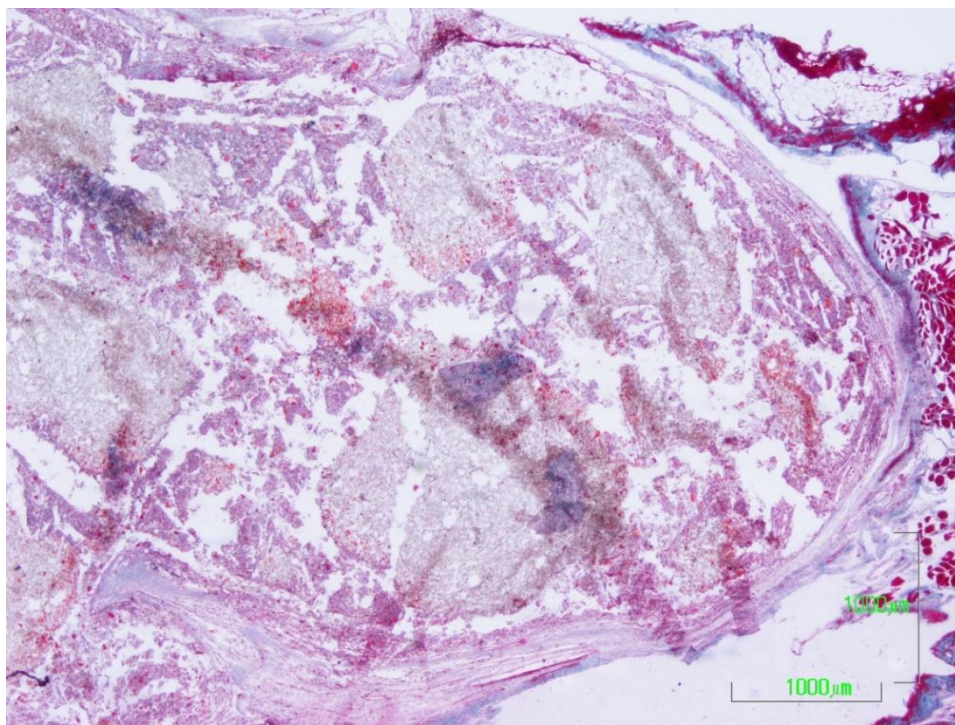


Fig 47. C11. Tejido de granulación. Formación de tejido conectivo a modo de cápsula delimitando los restos de material. 2x

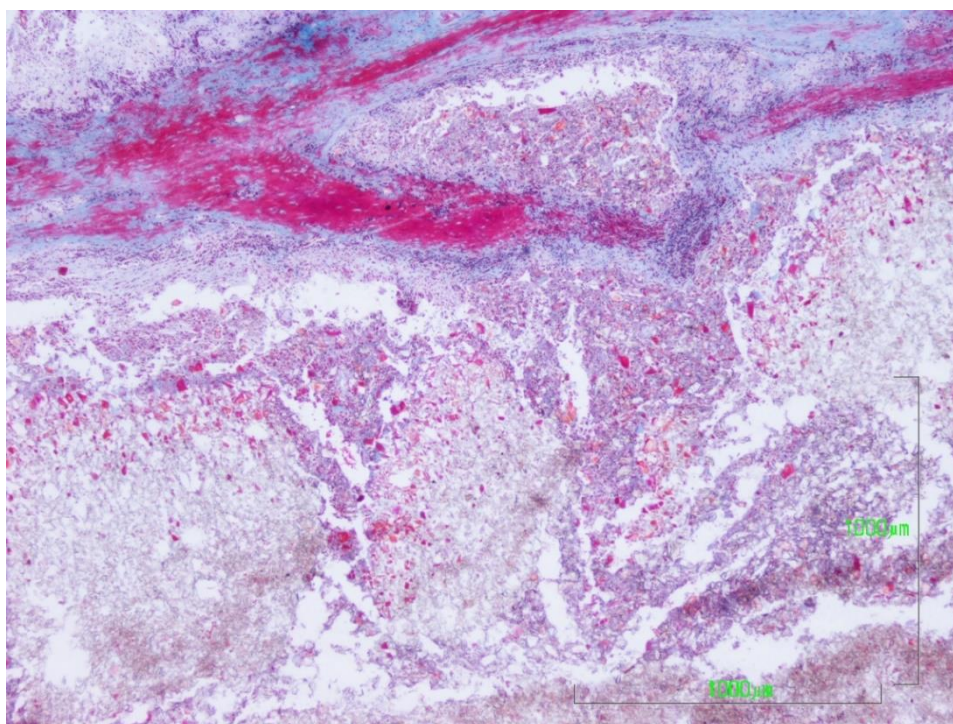


Fig 48. C11. Restos de material sin reacción celular asociada, rodeados por tejido conectivo. 4x

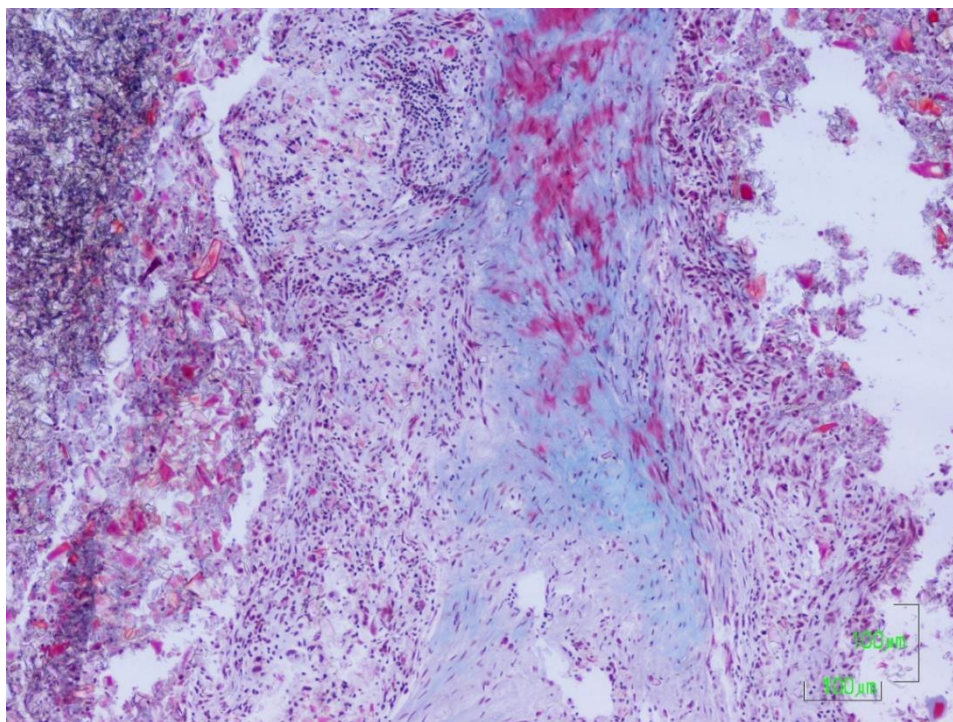


Fig 49. C11. Reacción celular de tipo inflamatorio en la interfaz entra los restos de material y el tejido conectivo que lo delimita. 10x

Grupo B+C

La respuesta mayoritaria en este grupo es la de la formación de un tejido de granulación asociado a procesos de fibrosis. No se produce regeneración ósea del defecto en general, salvo en uno de los casos. El hueso neoformado presenta un entramado óseo de finas trabéculas anastomosadas y desorganizadas (figura 50). Es inmaduro, con zonas no mineralizadas además de gruesos ribetes de osteoide, asociados a hileras de osteoblastos y zonas de reabsorción (figura 51).

Sin embargo, en su mayoría el defecto se encuentra ocupado por la formación de tejido conectivo asociado a un elevado componente celular, compuesto por un gran número de macrófagos, monocitos y células plasmáticas, signo de una respuesta inflamatoria de tipo crónico (figuras 52 y 53). Con relación a los restos de material, estos pueden aparecer de forma dispersa, sin reacción celular, mientras que otros se encuentran en asociación a células multinucleadas (figura 54).

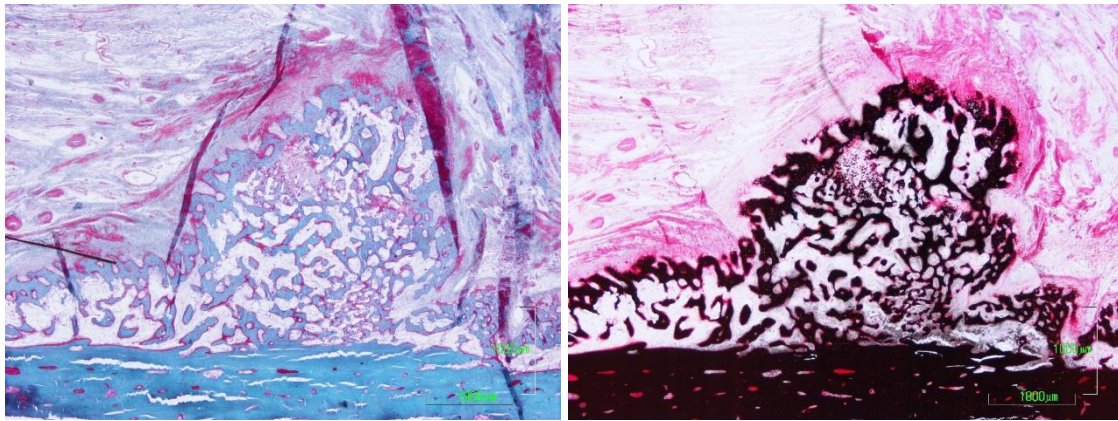


Fig.50. Panorámica que refleja procesos de neoformación ósea, constituida por hueso trabecular desorganizado e inmaduro. a) TG, b) VK. 2x.

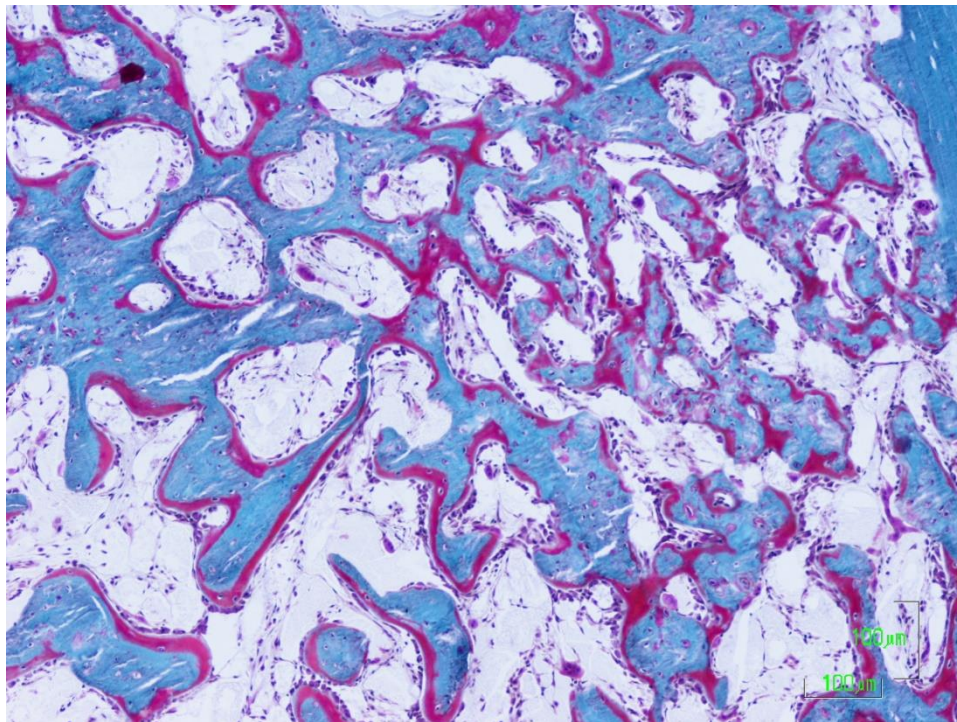


Fig 51. Detalle del hueso regenerado constituido por hueso trabecular inmaduro, anastomosado, con gruesos ribetes de osteoide en asociación a hileras de osteoblastos con gran actividad sintética. Se aprecia la presencia de osteoclastos. 10x

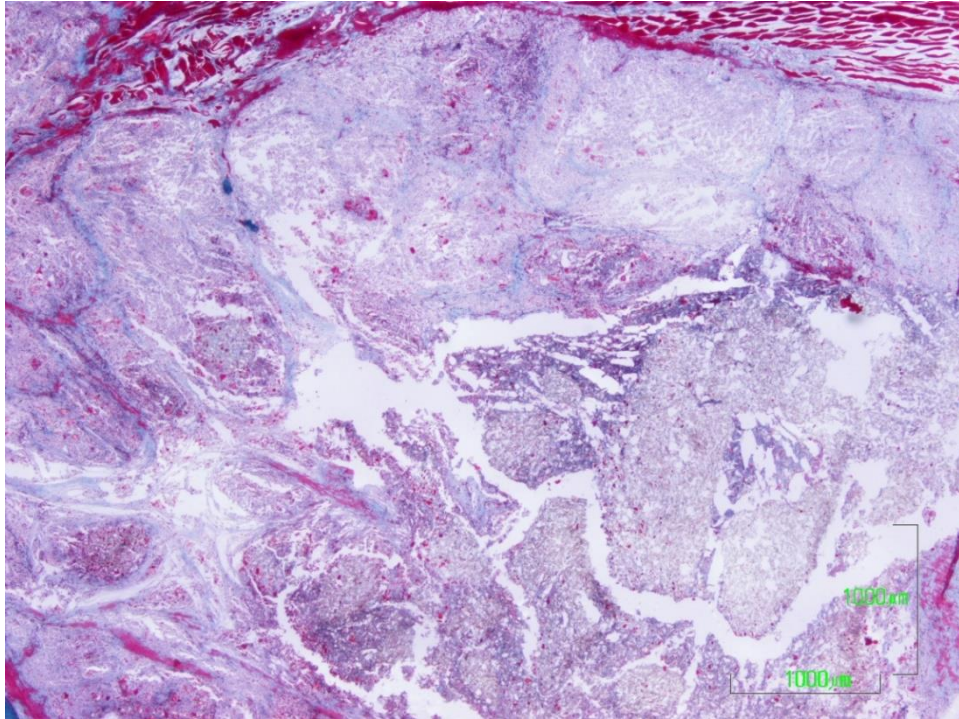


Fig 52. Defecto óseo no regenerado. Formación de tejido granulomatoso. 2x.

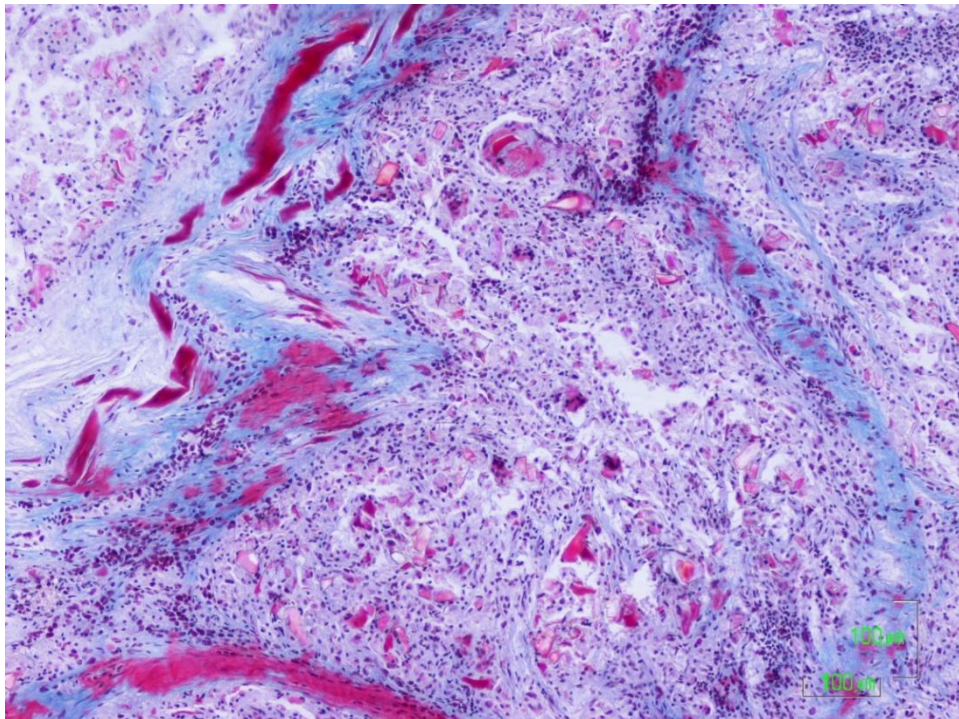


Fig 53. Desarrollo de tejido conectivo desorganizado junto con restos de material asociados a una moderada respuesta tisular inflamatoria. 10x.

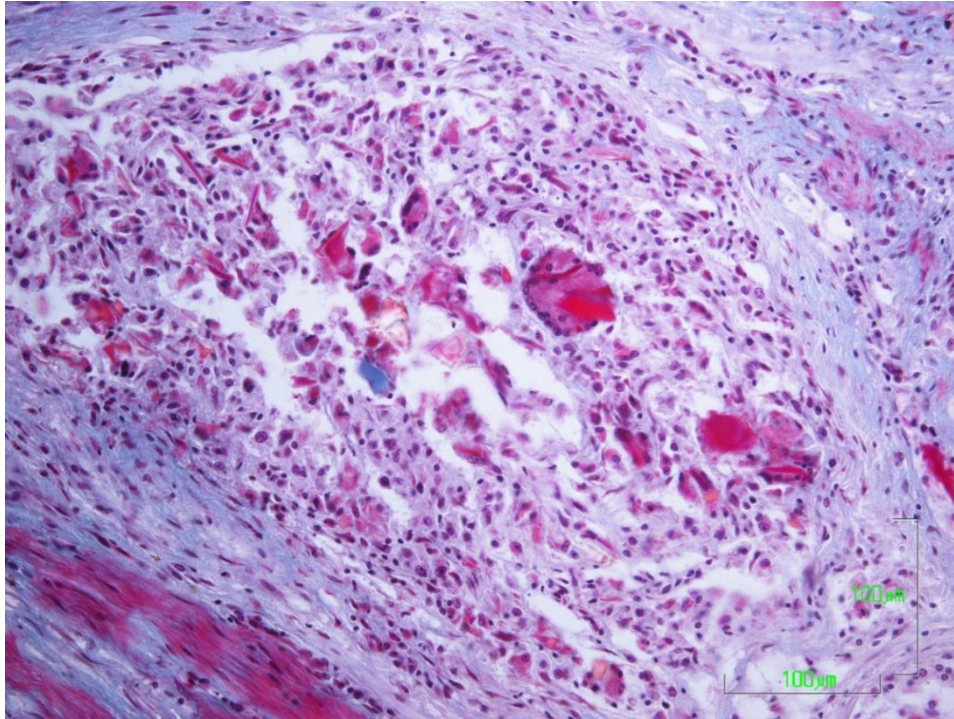


Fig 54. Reacción fibrosa englobando restos de material, que se encuentran en asociación con numerosos macrófagos y alguna célula multinucleada. 20x

Grupo B+O:

En este grupo encontramos respuestas tisulares algo heterogéneas entre los diferentes especímenes con relación al material. En tres de los cuatro casos se aprecian discretos procesos de regeneración ósea. Existe una reacción del tejido óseo adyacente al defecto, de forma que encontramos procesos de osificación (figuras 55 y 58). Existe un hueso inmaduro con grandes cavidades vasculares y una gran actividad sintética (figuras 56, 59 y 60), en cuya matriz ósea primitiva encontramos englobados osteocitos inmaduros (figura 57). El hueso trabecular regenerado en algunas zonas está formado por finas trabéculas que presentan gruesos ribetes de osteoide, matriz ósea orgánica, sintetizada por las hileras de osteoblastos presentes (figura 58). Así mismo en la superficie ósea encontramos osteoclastos relacionados con los procesos de reabsorción (figuras 59, 61 y 62). En relación a la reacción tisular desencadenada en la cavidad del defecto, encontramos respuestas muy diversas.

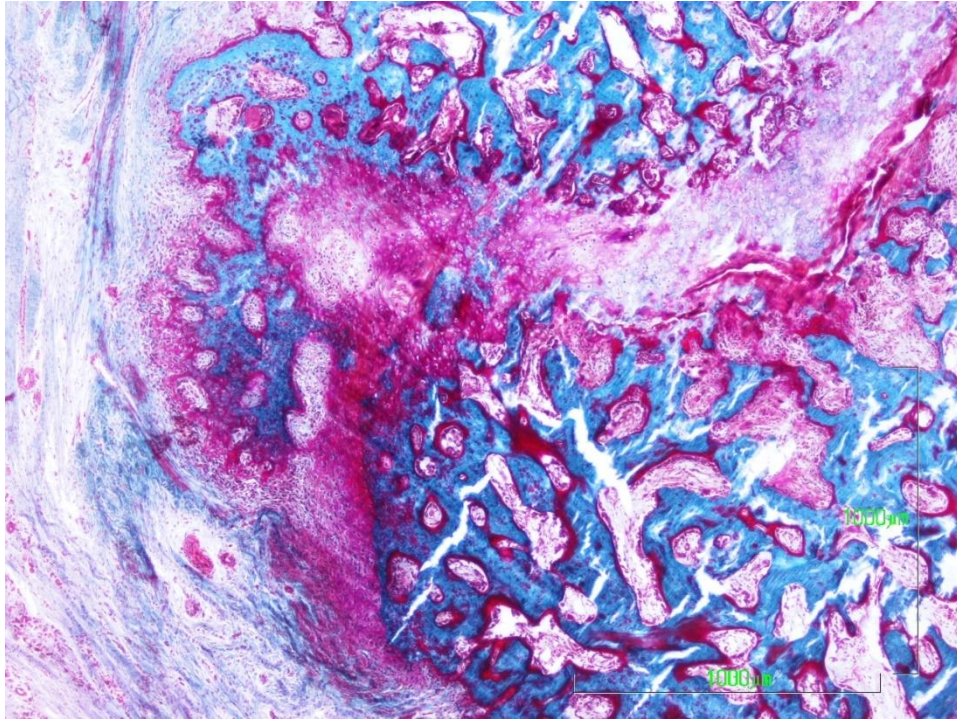


Fig 55. Hueso trabecular inmaduro. Disposición irregular de las trabéculas óseas, anastomosadas y con superficies óseas con gruesos depósitos de osteoide. 4x

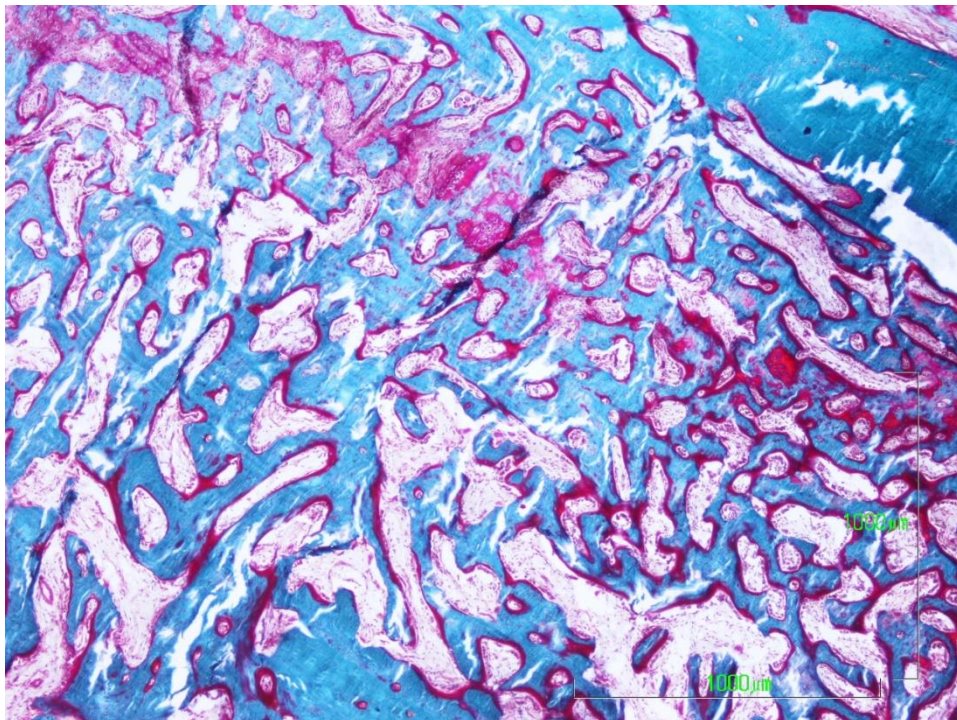


Fig 56. Imagen panorámica de hueso trabecular regenerado con numerosas y amplias cavidades vasculares y gran actividad sintética, reflejada por los gruesos ribetes de osteoide. 4x

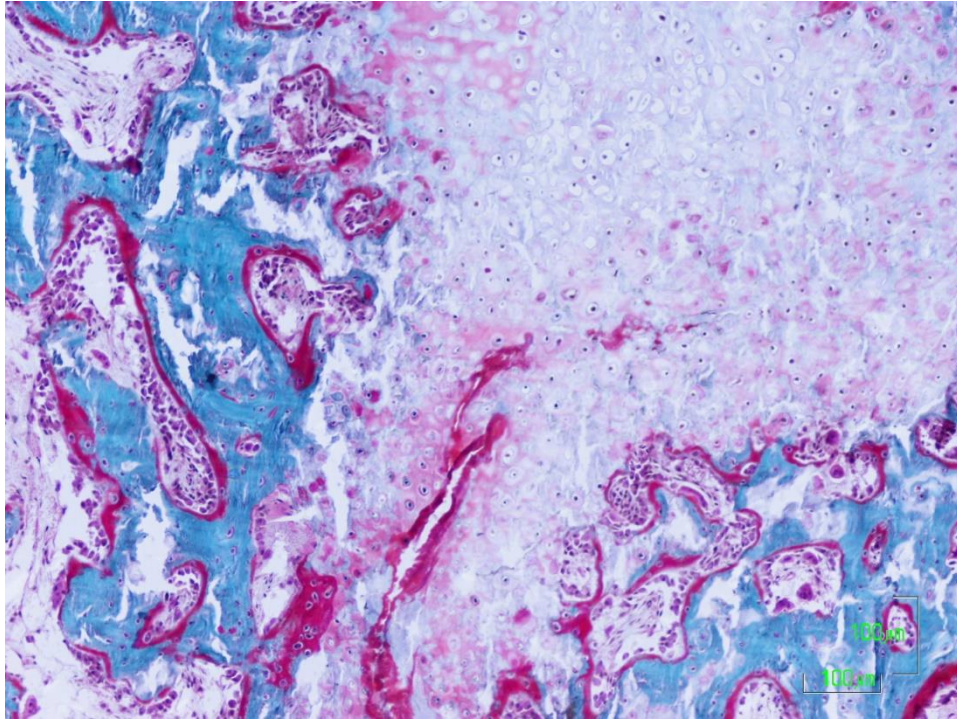


Fig 57. Detalle del proceso de osificación. Se distinguen los osteocitos englobados por una matriz ósea inmadura, no mineralizada (color rojo), Gran actividad osteoblástica asociada a ribetes de osteoide y presencia de procesos de reabsorción mediada por osteoclastos. 20x

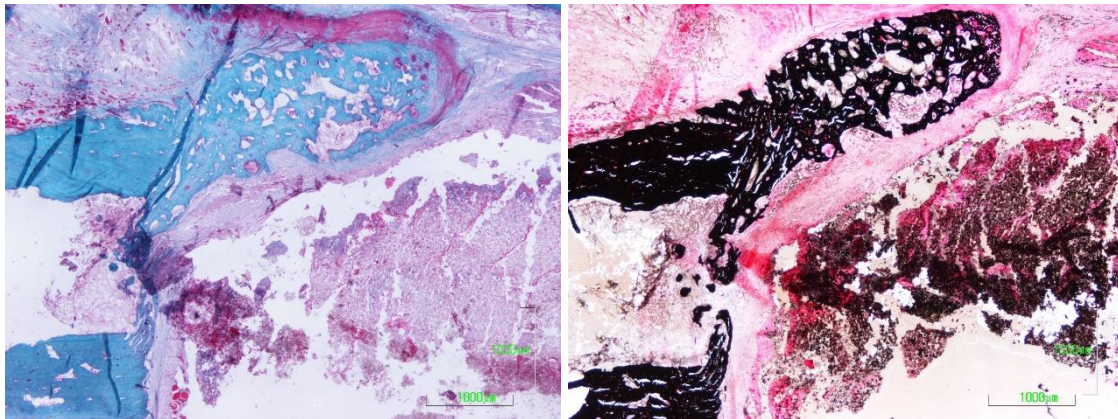


Fig 58. C14. Panorámica que refleja una reacción de formación de hueso inmaduro, desorganizado en el hueso adyacente a la cavidad del defecto. Además, se aprecian grandes depósitos de material, rodeados por tejido conectivo fibroso 2x. TG y VK

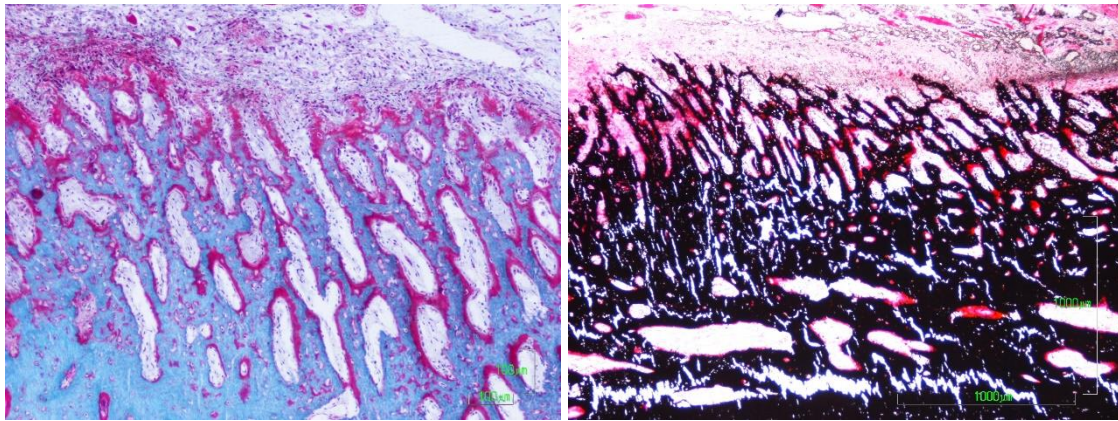


Fig 59. Hueso trabecular inmaduro. Presencia de osteocitos en cavidades aún no mineralizadas y gruesos ribetes de osteoide. 10x. Fig 60. Hueso trabecular inmaduro con gruesos ribetes de osteoide en la superficie trabecular ósea. 4x VK

4x VK

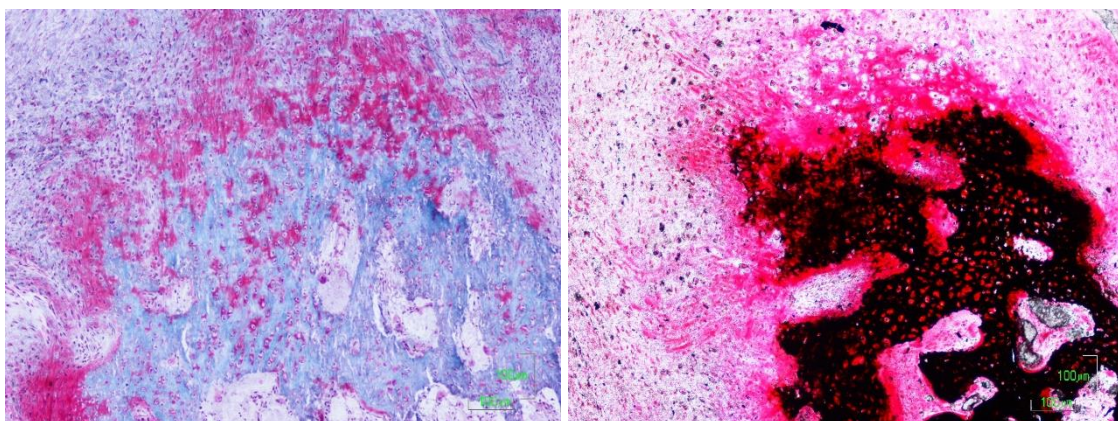


Fig 61. a) Hueso trabecular inmaduro, con zonas de matriz ósea aún no mineralizadas. Presencia de osteocitos inmaduros y osteoclastos en las lagunas de reabsorción ósea. 10x. Fig 62. Hueso inmaduro con aspecto apolillado debido a la presencia de osteocitos rodeados por matriz ósea no mineralizada (rojo). Presencia de matriz no calcificada 10x. VK

Grupo B+C+O:

Este grupo compuesto por 3 casos presenta una respuesta relativamente homogénea, encontrando tejido de granulación en la cavidad del defecto óseo (figura 63). Respecto a la celularidad existe un predominio de macrófagos y fibroblastos, encontrando alguna célula multinucleada y focos de

células plasmáticas (figura 64). El desarrollo de tejido conectivo es notable, encontrando tanto de tipo laxo como denso, con una distribución muy organizada de las fibras colágenas.

Por otro lado, se ha encontrado reacción del hueso adyacente a la cavidad del defecto en dos de los casos, apareciendo hueso desorganizado, con lagunas vasculares, en los extremos óseos (figura 65). La mayor diferencia está en relación con reacción tisular desencadenada frente a los restos de material y la cantidad de éste (figura 66).

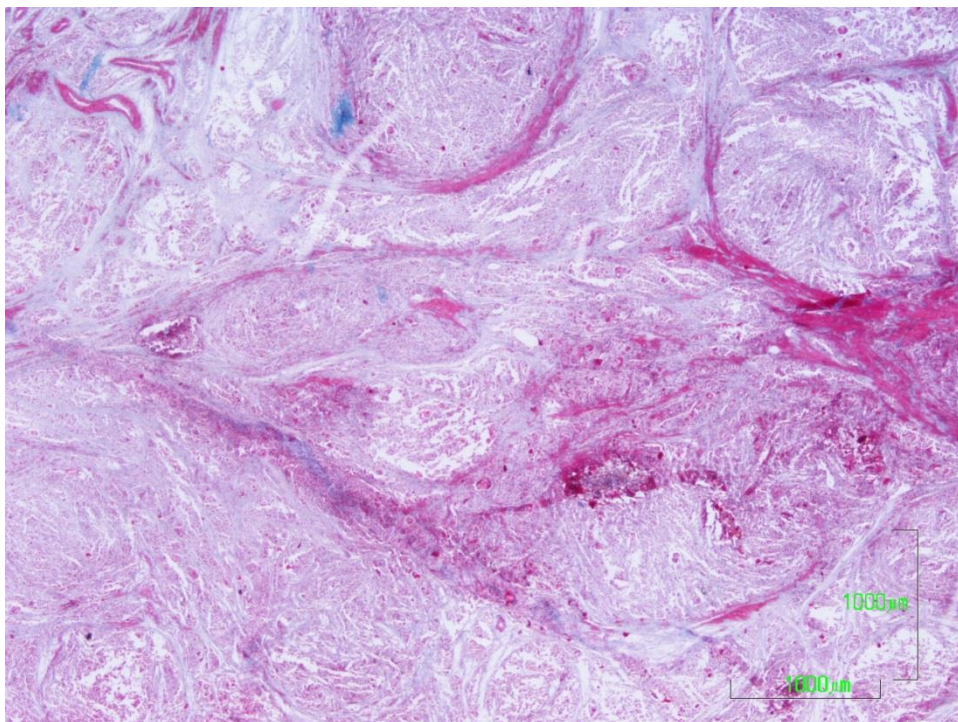


Fig 63. Panorámica de la cavidad del defecto donde se ha desarrollado granulomas. 2x

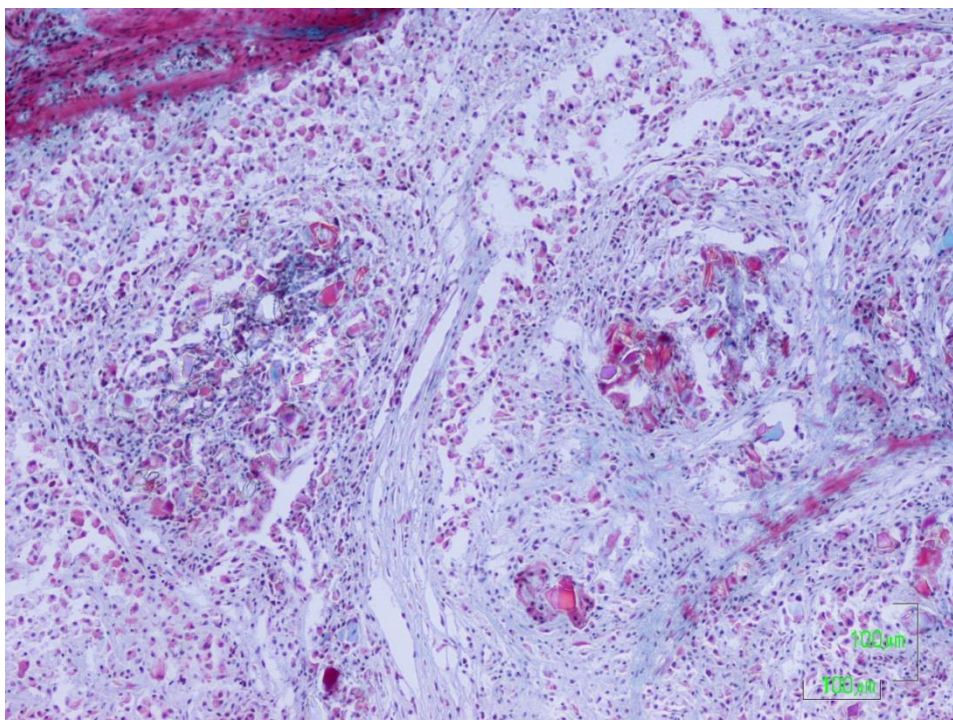


Fig 64. Tejido de granulación donde distinguimos macrófagos, fibroblastos, células multinucleadas y células plasmáticas. Presencia de escasos restos de material. 10x

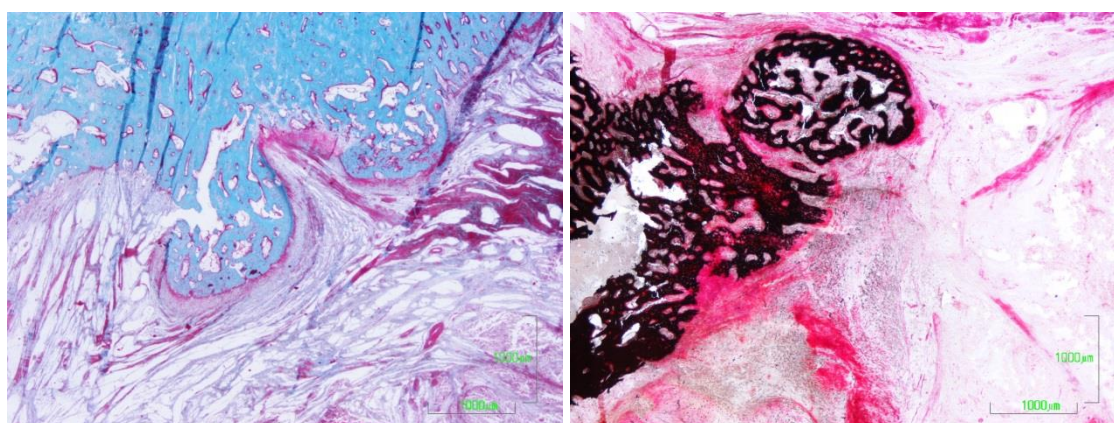


Fig 65. Panorámica de la reacción ósea producida en el hueso adyacente al defecto óseo. a) TG y b) VK. 2x.

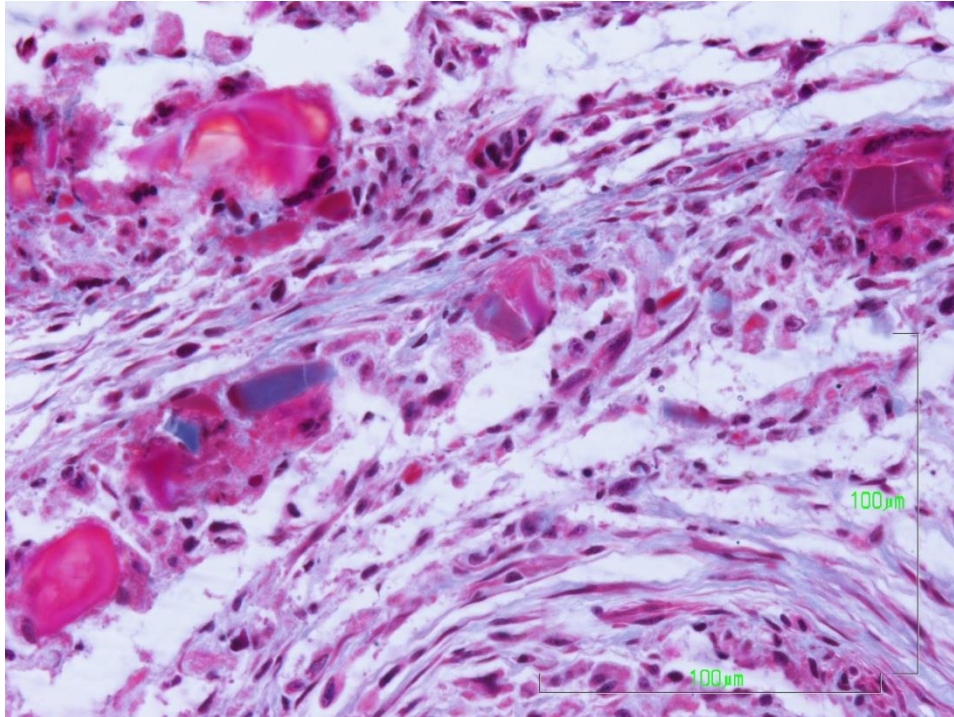


Fig 66. Detalle de células multinucleadas englobando restos de material. 40x.

- **Seguimiento de 12 semanas**

Grupo control: B (una única muestra)

En el grupo control de 12 semanas el defecto óseo no está regenerado. En este tiempo de experimentación encontramos numerosos restos de material con escasa o prácticamente nula respuesta celular (figura 67). El tejido conectivo, levemente desarrollado, presenta escaso componente celular, compuesto por fibroblastos y algún macrófago (figura 68). La respuesta tisular se encuentra en un estadio quiescente. No encontramos respuesta inflamatoria asociada a la presencia de material (figura 69).

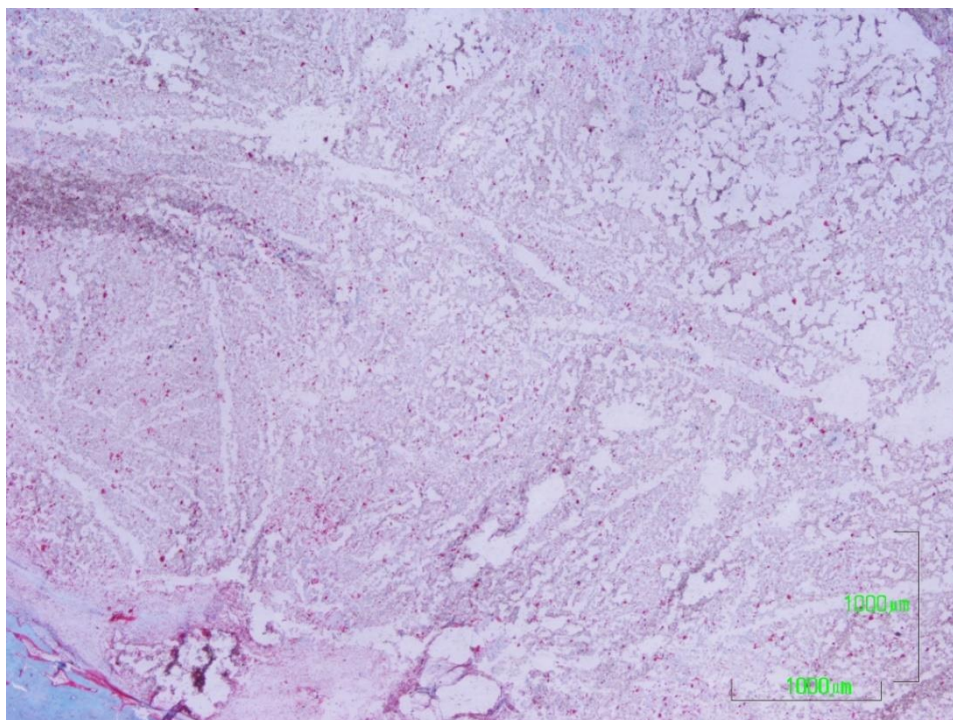


Fig 67. C5. Defecto óseo sin regenerar. Restos de material sin reacción celular asociada. 2x.

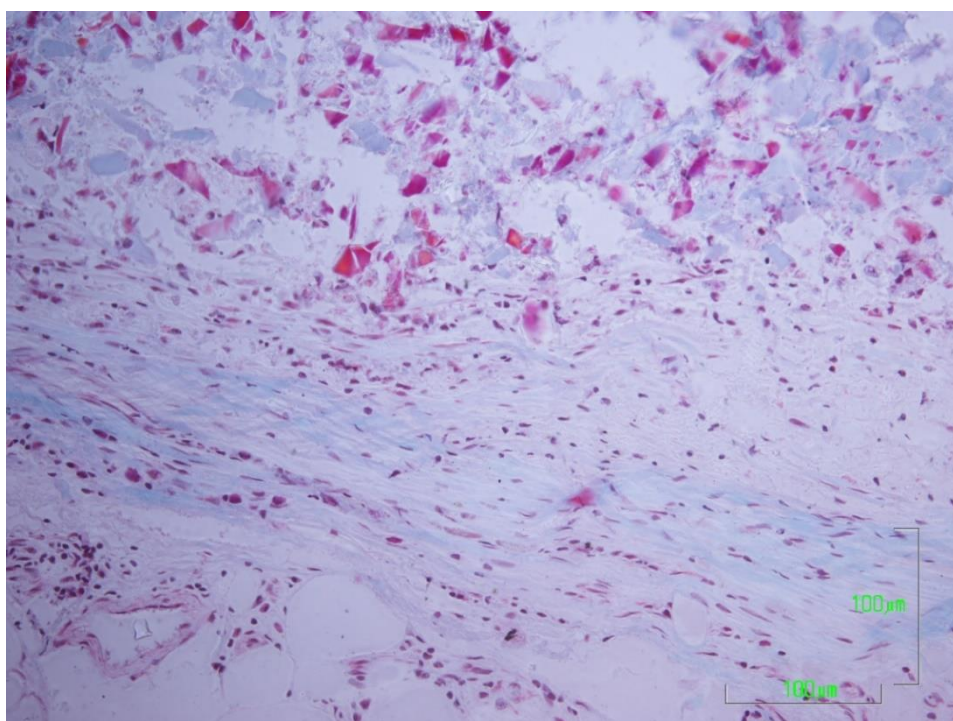


Fig 68. C5. Tenue desarrollo de tejido conectivo que delimita los restos de material. Componente celular escaso, con presencia de escasos macrófagos y fibroblastos. 20x

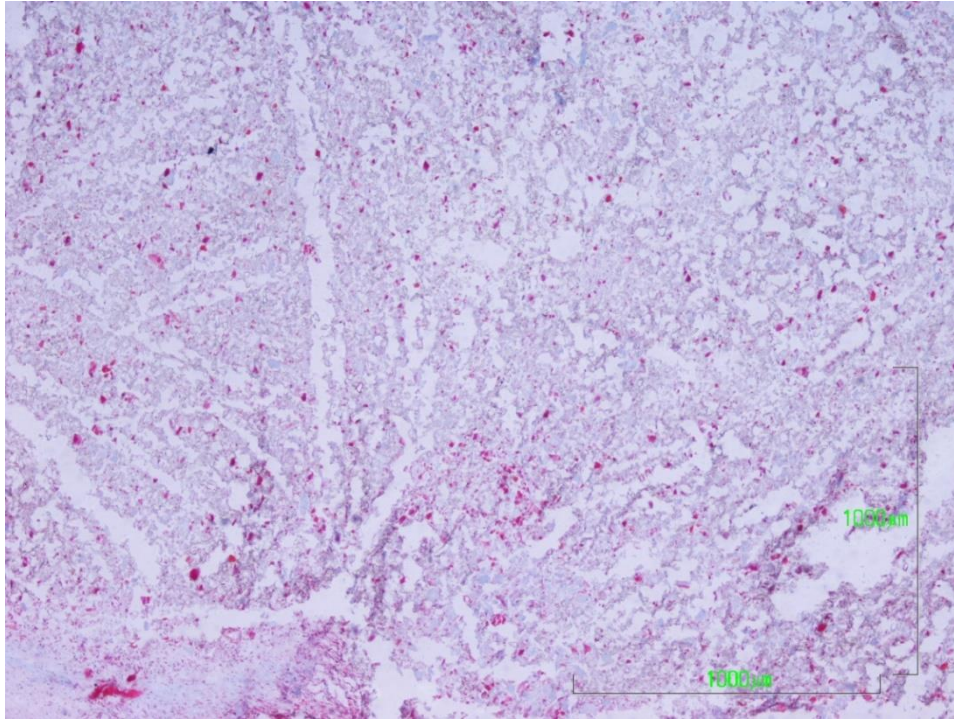


Fig 69. C5. Restos de material quiescentes. Ausencia de respuesta inflamatoria. 4x

Grupo B+C

En dos de los casos encontramos cierta reacción ósea con la formación de un saliente óseo (figura 70). El hueso regenerado es inmaduro, con numerosas lagunas vasculares, gruesos ribetes de osteoide en la superficie ósea y zonas de reabsorción ósea donde se aprecian osteoclastos. Además, los osteocitos se encuentran englobados en matriz ósea aún no calcificada (figuras 71 y 72). En el resto del defecto se ha desarrollado un tejido conectivo vascularizado con un elevado número de macrófagos y algunas células plasmáticas (figura 73). Existen zonas con tejido adiposo.

En tres de los casos, la reacción tisular desencadenada está constituida por tejido de granulación, compuesto por células multinucleadas, macrófagos y focos de células plasmáticas (figura 74). El tejido conectivo se dispone en forma de tabiques o glomérulos que rodean al componente celular. De forma generalizada, en este grupo, en relación con los restos de material o bien son escasos y se encuentran en asociación con el componente celular, o bien no hay.

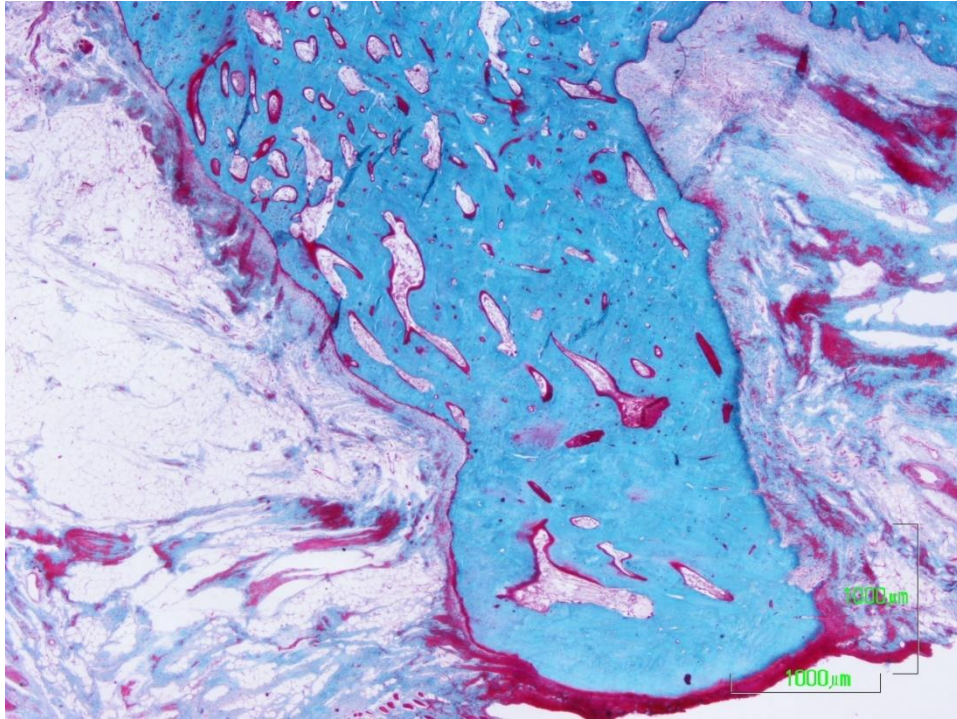


Fig 70. Panorámica de zona de hueso regenerado, inmaduro, desorganizado y con zonas no mineralizadas. 2x

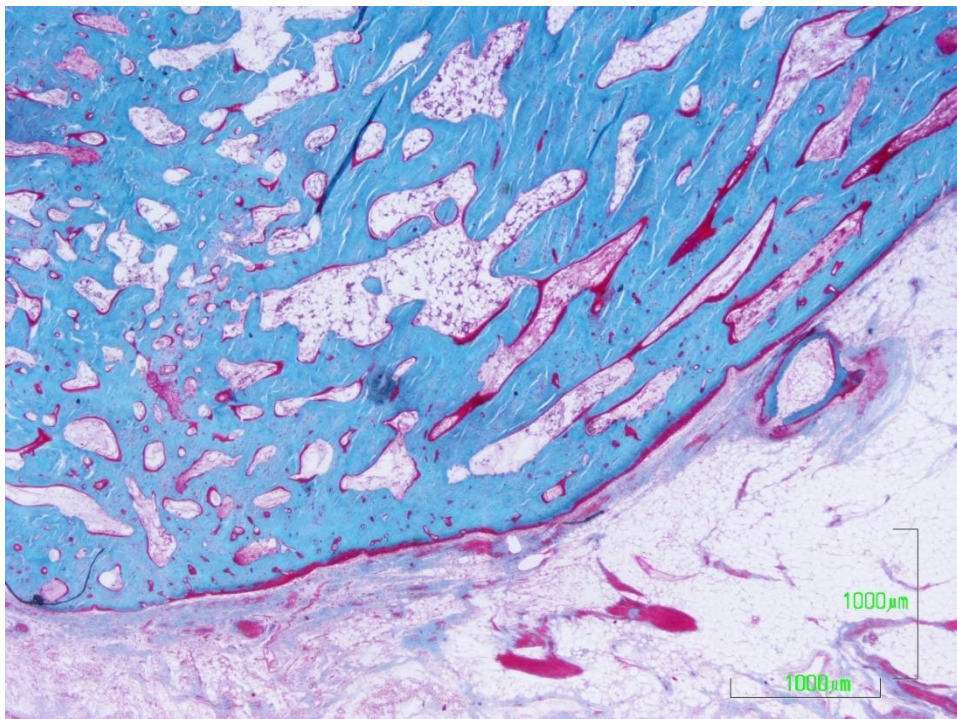


Fig 71. Panorámica de hueso neoformado: desorganizado, con numerosas lagunas vasculares, ribetes de osteoide y zonas no calcificadas. 2x

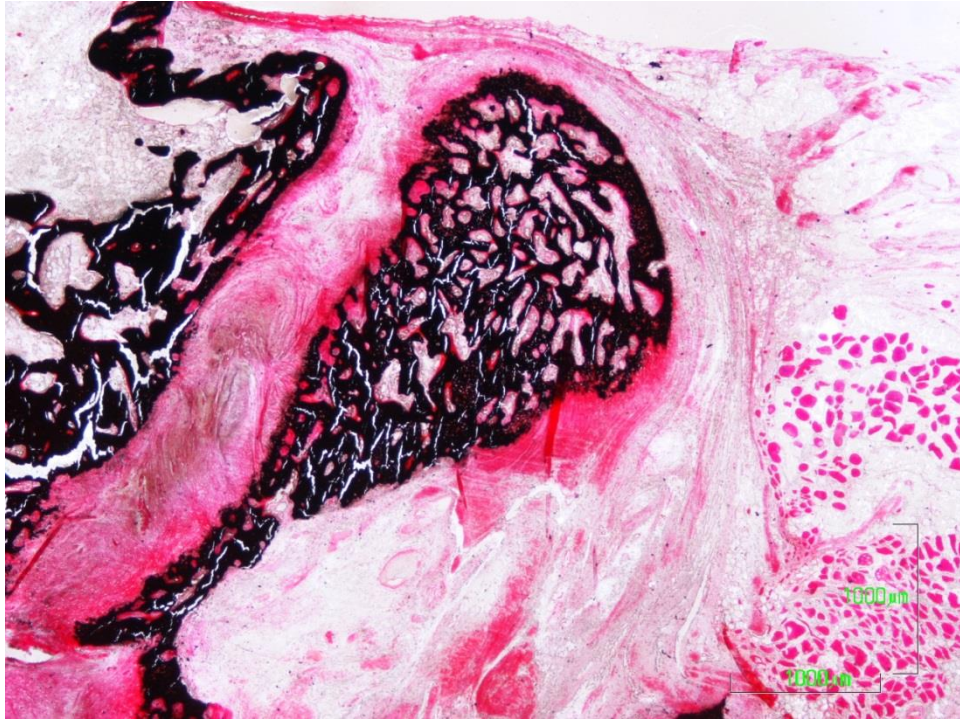


Fig 72. Hueso trabecular inmaduro, desorganizado con zonas aún no mineralizadas. 2x

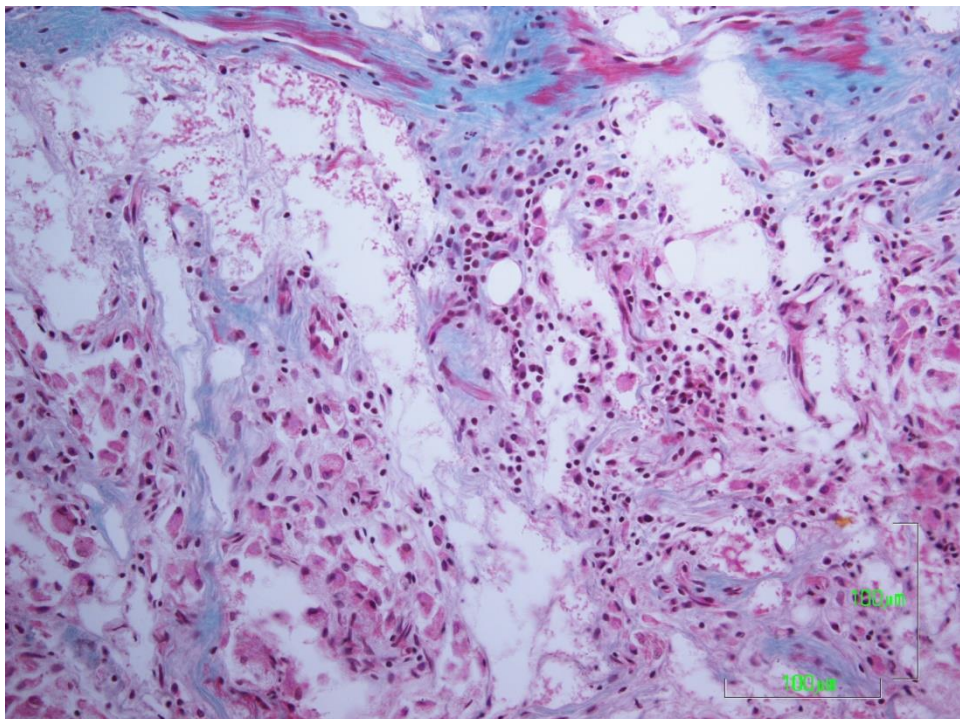


Fig 73. Detalle de tejido conectivo con la presencia de macrófagos y focos de células plasmáticas. 20x

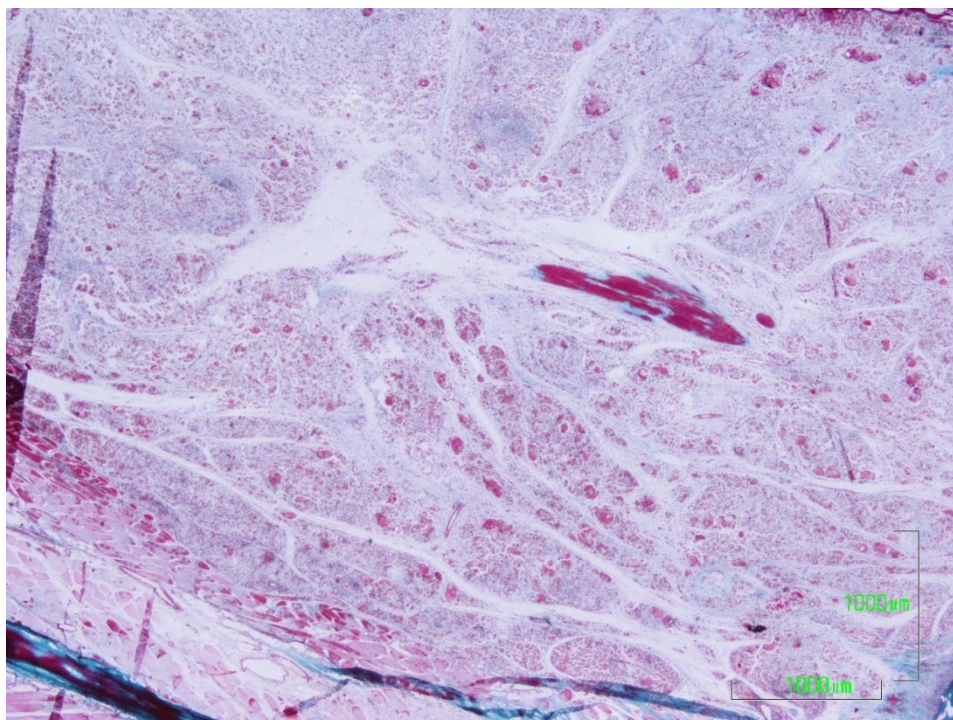


Fig 74. Panorámica de la cavidad del defecto con el desarrollo de una reacción granulomatosa. 2x

Grupo B+O

De los cuatro casos que constituyen este grupo, tres presentan una formación similar a la que observamos en un caso del mismo grupo a las 6 semanas. Lo que encontramos es una formación conjuntiva de aspecto fibroso denso, en la vecindad de tejido óseo normal. Se encuentra entre medias de formaciones óseas, que presenta tanto hueso compacto como trabecular (figuras 75 y 76). El hueso limitante a esta formación fibrosa presenta cierto grado de madurez al presentar médula ósea hematopoyética (MOH). Debido a esto, se podría considerar que corresponde al hueso esponjoso que se encuentra entre las dos placas de hueso compacto. Esta formación conectiva, presenta una morfología similar al fibrocartilago, con gruesas fibras colágenas y elevado componente celular, que recuerda los condrocitos, aunque como no presentan grupos isogénicos quizás debamos pensar en fibroblastos (figura 77). El hueso está desorganizado, presenta cavidades vasculares de gran tamaño y en la superficie ósea trabecular inmadura se aprecian gruesos ribetes de osteoide, además de zonas no mineralizadas.

Con relación a la reacción tisular desencadenada en el centro de la cavidad del defecto encontramos granulomas de componente celular formado por macrófagos, con un amplio citoplasma, células plasmáticas, fibroblastos y escasas células multinucleadas (figura 78). Los restos de material son escasos.

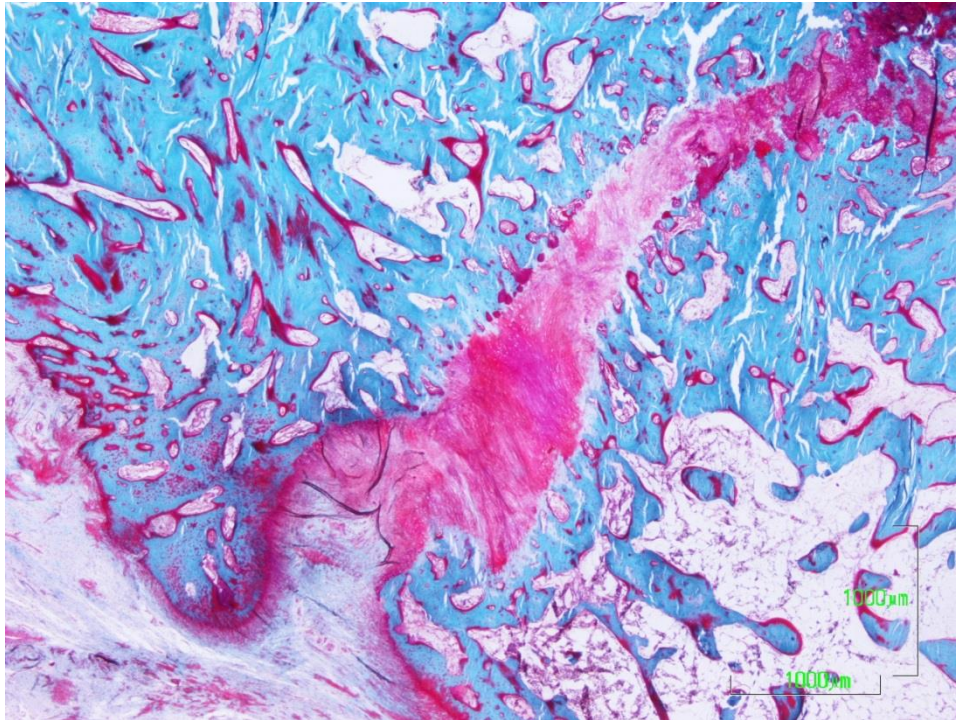


Fig 75. Panorámica de la formación fibrosa entre dos formaciones óseas. El hueso se muestra desorganizado con numerosas y amplias lagunas vasculares. 2x

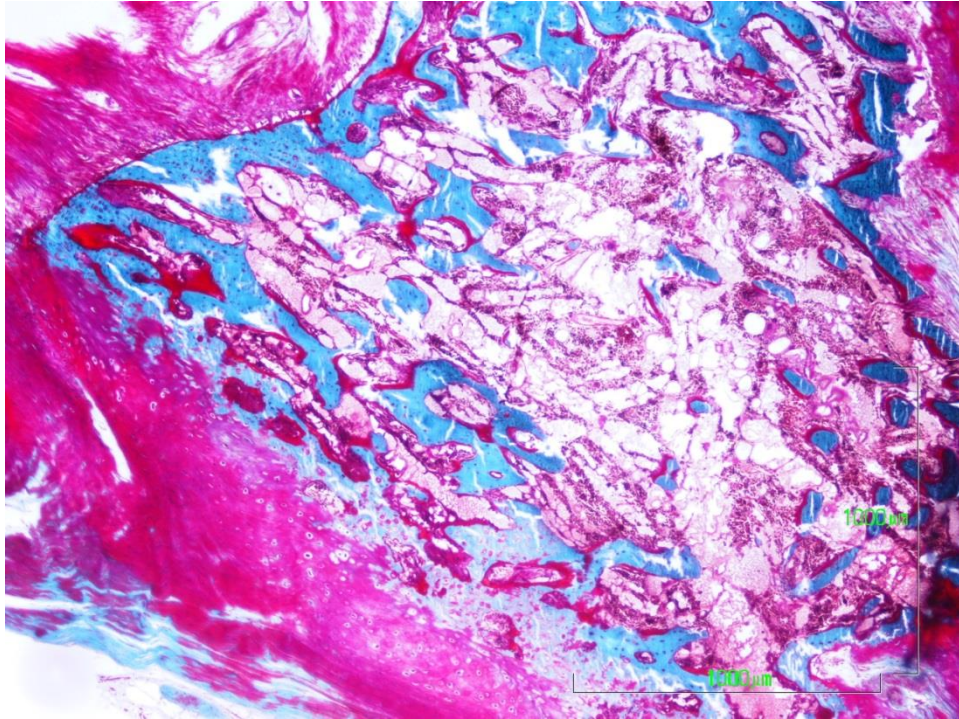


Fig 76. Hueso trabecular inmaduro, en transición con tejido conectivo denso. Presencia de médula ósea hematopoyética en la cavidad medular. 4x

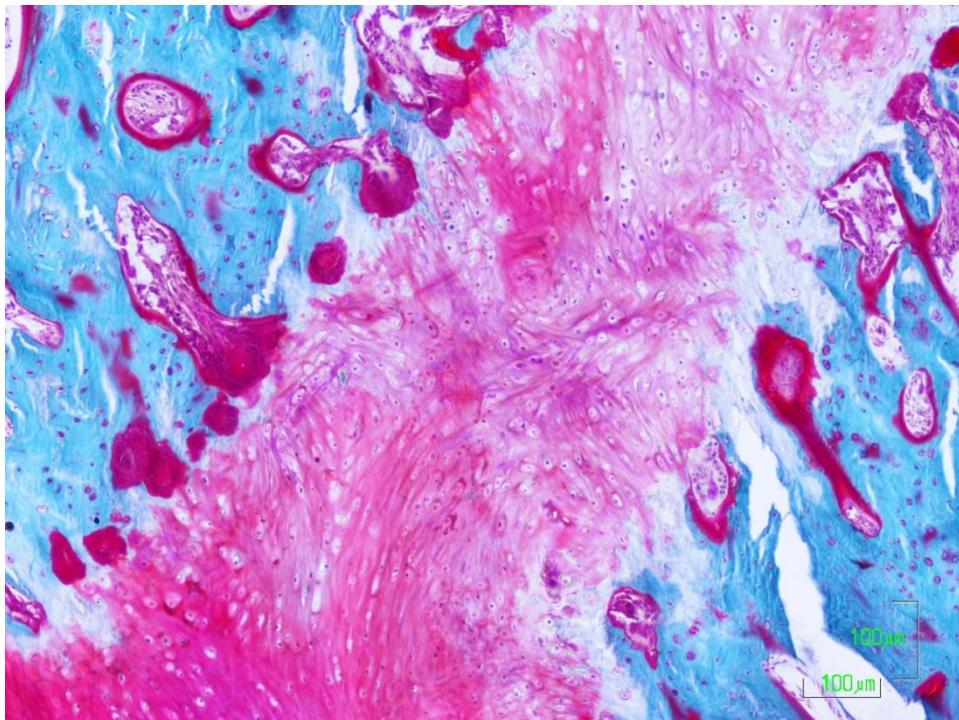


Fig 77. Detalle de la formación fibrosa con elevado componente celular en vecindad de tejido óseo. 10x

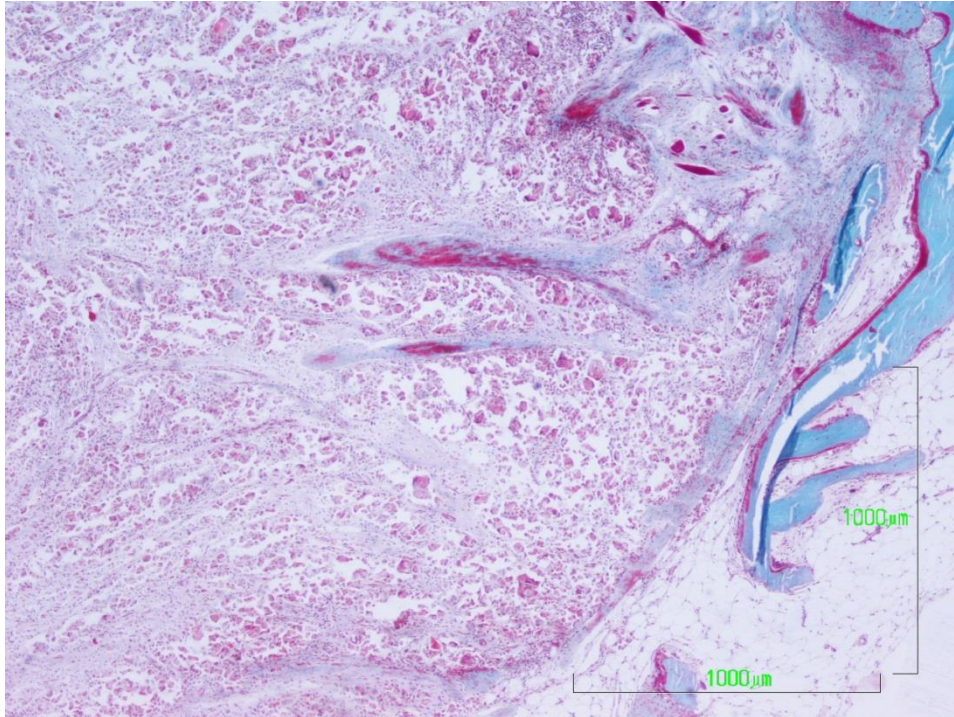


Fig 78. Tejido de granulación desarrollado en la cavidad del defecto. 4x

Grupo B+C+O

Este grupo compuesto por cuatro casos, uno de los cuales no se ha podido valorar en su totalidad, presenta respuestas muy dispares, no pudiendo encontrar un comportamiento similar entre ellos. Por ello, se exponen imágenes individualizadas tanto a continuación, como en anexo de resultados.

A modo de resumen, en uno de los casos se ha podido apreciar una amplia reacción inflamatoria. En otro, encontramos fenómenos de regeneración ósea, con formación de hueso trabecular inmaduro, con grandes cavidades vasculares distribuidas de forma muy heterogénea (figura 79). Una de las respuestas más dispares, y no encontrada previamente, es en otro de los casos de este grupo en el que la cavidad del defecto presenta tejido adiposo (figuras 80 y 81). No hay restos de material y aparece un escaso componente celular.

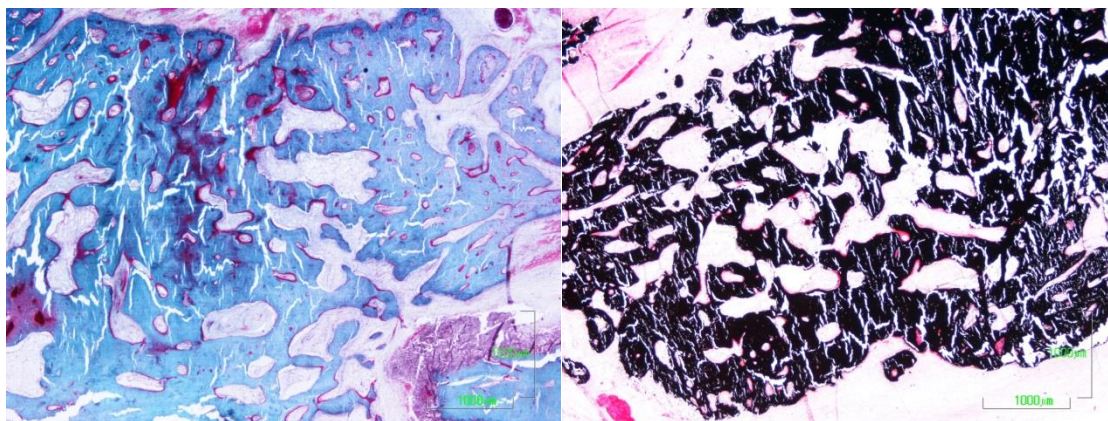


Fig 79. C7. Panorámica de la cavidad del defecto que refleja un hueso regenerado, con disposición irregular de las trabéculas y zonas aún no totalmente mineralizadas. En la parte inferior derecha se aprecia un granuloma en asociación al hueso. TG y VK. 2x

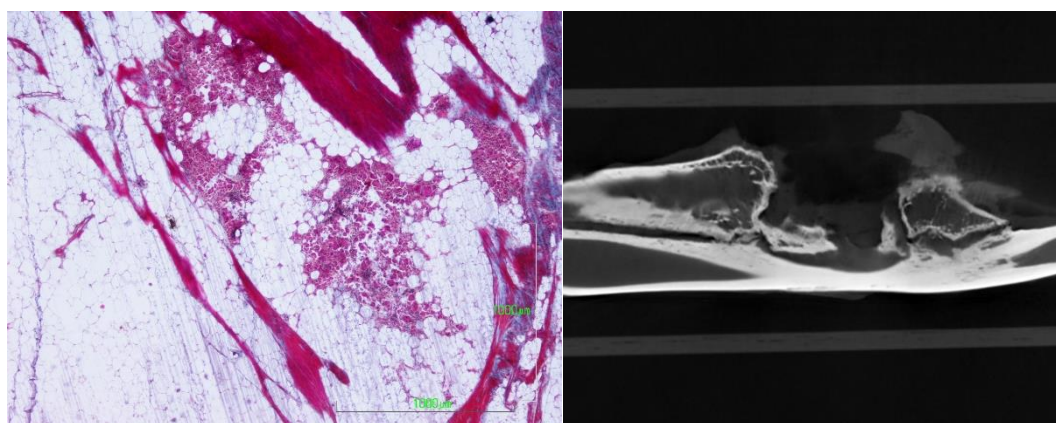


Fig 80. C6. Panorámica que refleja una cavidad del defecto ocupada en su mayoría por tejido adiposo, con focos de células gigantes multinucleadas. TG. 4x, Fig 81. TAC correspondiente.

En el último caso, aparece la misma formación que en tres de los casos del grupo anterior (B+O), en la encontramos una formación conectiva entre dos formaciones óseas (figura 82). No obstante, la respuesta tisular mayoritaria es la de formación de granulomas con abundantes restos de material en asociación a macrófagos, células gigantes multinucleadas y células plasmáticas.

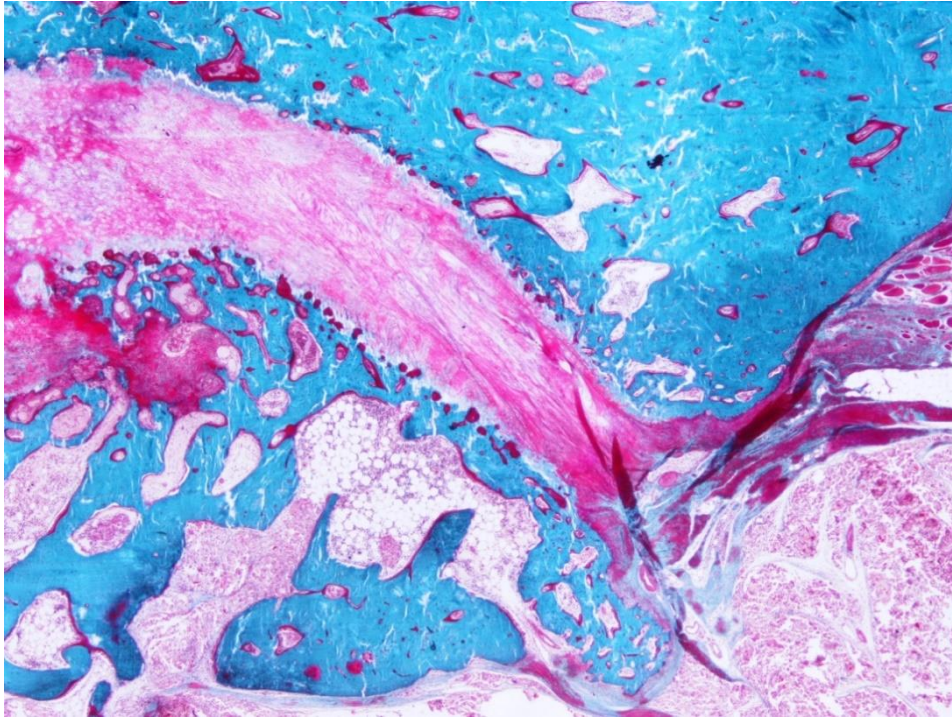


Fig 82. C21. Panorámica que hace evidente la formación fibrosa entre dos fragmentos óseos. 2x

5.2.2. Resumen de resultados histológicos

Seguimiento de 6 semanas

Con relación a la respuesta ósea, hay más reacción del hueso adyacente a la cavidad del defecto en los casos del grupo B+O, encontrando procesos de formación ósea más activos, que presentan hueso regenerado.

En referencia a los restos de material, en función de que haya o no invasión celular de los mismos, la respuesta es heterogénea. En algunos casos no hay reacción celular asociada, encontrando grandes cúmulos de material en el centro del defecto. En otros, existe una gran reacción tisular asociada constituida sobre todo por macrófagos y células gigantes multinucleadas. En un último grupo de casos, los restos de material son muy dispersos y se han degradado desapareciendo casi en su totalidad.

Tenido en cuenta el factor de maduración del tejido conectivo desarrollado en la cavidad del defecto, el grupo B+C presenta una mayor maduración del tejido conectivo, con más áreas de coloración roja.

Un caso del grupo B+O presenta la formación de hueso más tejido conectivo más hueso; podría ser quizá un signo de osificación endocondral.

Seguimiento de 12 semanas

De forma muy similar a la respuesta tisular encontrada a las 6 semanas de experimentación, tras 12 semanas de evolución el grupo que presenta más procesos de formación ósea es el B+O. Además, es el grupo con una respuesta más homogénea, ya que el caso del grupo B+C+O hay grandes diferencias entre los casos.

Respecto a la presencia de restos de material, de forma generalizada en todos los grupos, estos, o bien son pocos o están ausentes, lo que implica una degradación de material.

En el resto de la cavidad del defecto encontramos en general tejido de granulación, fibrosándose y colagenándose. El tejido conectivo se encuentra más desarrollado, en diferentes estadios de maduración y más extendido, no en forma solo de tabiques, sino con una distribución de fibras más heterogénea. En asociación encontramos un componente celular más o menos marcado compuesto por macrófagos, células plasmáticas y células gigantes.

5.3 Resultados del análisis de imagen

5.3.1 Análisis detallado de las muestras

25 muestras fueron analizadas con radiografía y escaneadas con el micro-TC de pequeño animal SuperArgus (SEDECAL) con un voltaje de 65 kV y una corriente de 600 μ A, cubriendo 360 grados con un total de 720 proyecciones. El tamaño de pixel en proyección fue de 0.075 mm y el tamaño de vóxel en reconstrucción de 0.058 mm isotrópico.

Con el micro-TC, analizamos las características del hueso neoformado mediante las variables descritas previamente en el apartado de material y métodos.

- Volumen de hueso en el área a estudio: BV/TV
- Estudio trabecular
 - Grosor trabecular (Tb.Th)
 - Número trabecular (Tb.N)
 - Separación trabecular (Tb.Sp)
- Estudio cortical
 - Ct.Ar (cortical bone area/cortical volumen, mm²)
 - Ct.Ar/Tt.Ar (cortical area fraction, %)
 - Ct.Th (average cortical thickness, mm)

Los parámetros se integraron en la interfaz, BoneAnalytics, que se maneja a través de su interfaz gráfica de usuario expuesta como van a ver a continuación.

Ejemplos de resultados obtenidos:

A continuación, se exponen tres resultados pertenecientes a cada uno de los grupos de estudio, B+C+O, B+O y B+C. En anexo de resultados se presenta el resto de casos.

En cada uno de ellos verán las medidas del volumen de hueso en las dos ROIs elegidas, el estudio trabecular y el estudio cortical en ambos extremos del defecto y realizando dos medidas en cada uno de ellos (figuras 83 a 107). Al final de cada caso, se expondrá la tabla de Excel con el registro de las medidas realizadas (tablas 10-12).

CASO C10

Datos: Tatuaje H594547. Grupo B+O. 12 semanas.

Volumen de hueso en el área a estudio: BV/TV

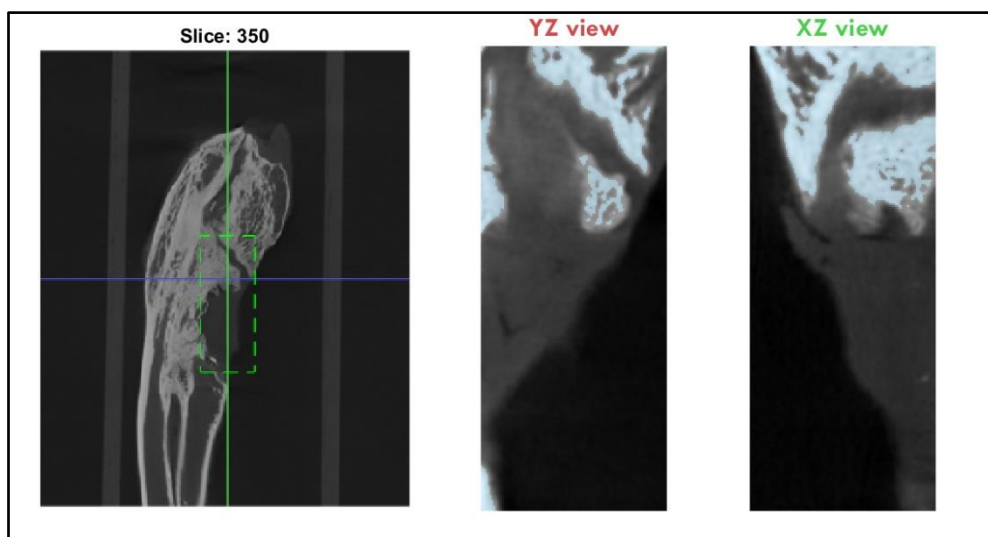


Fig 83. BV/TV ROIp

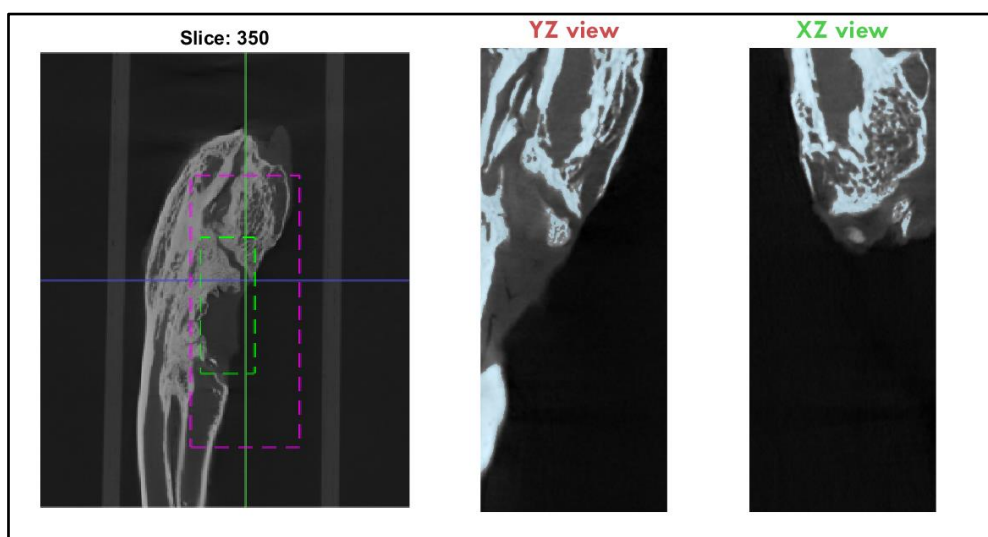


Fig 84. BV/TV ROIg

Estudio trabecular

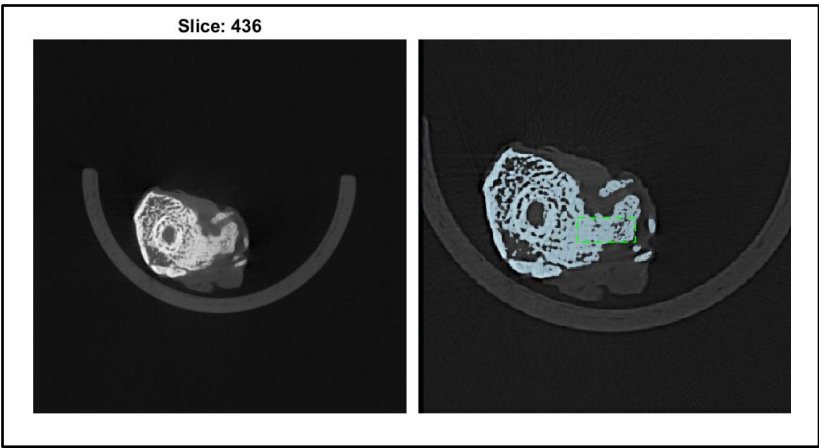


Fig 85. Corte axial estudio trabecular con y sin contraste

Estudio cortical

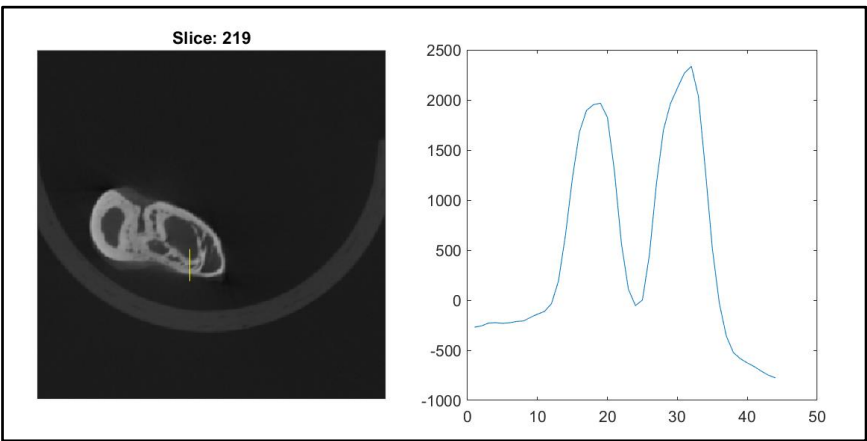


Fig 86. Estudio cortical en extremo de defecto creado

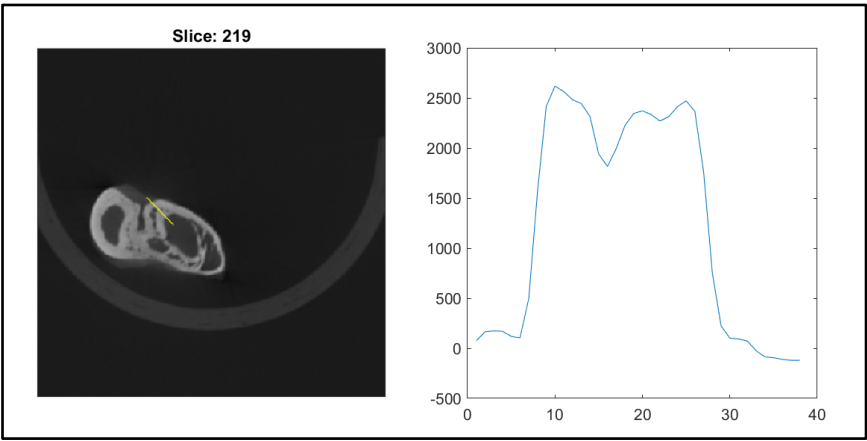


Fig 87. Estudio cortical en extremo de defecto creado

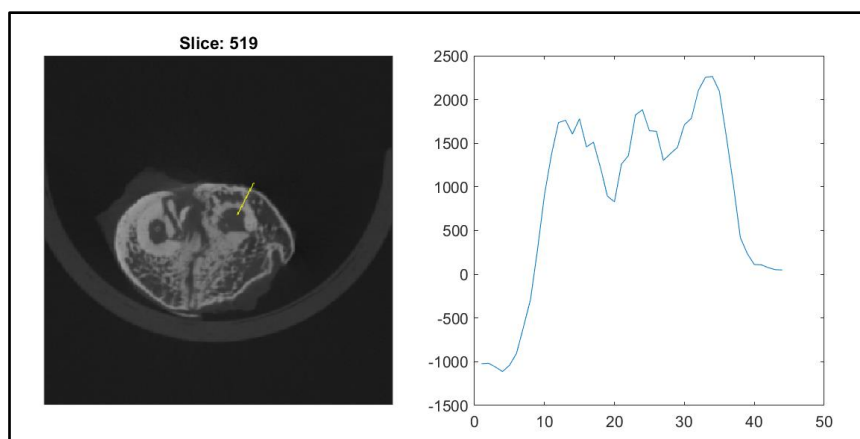


Fig 88. Estudio cortical en extremo de defecto creado

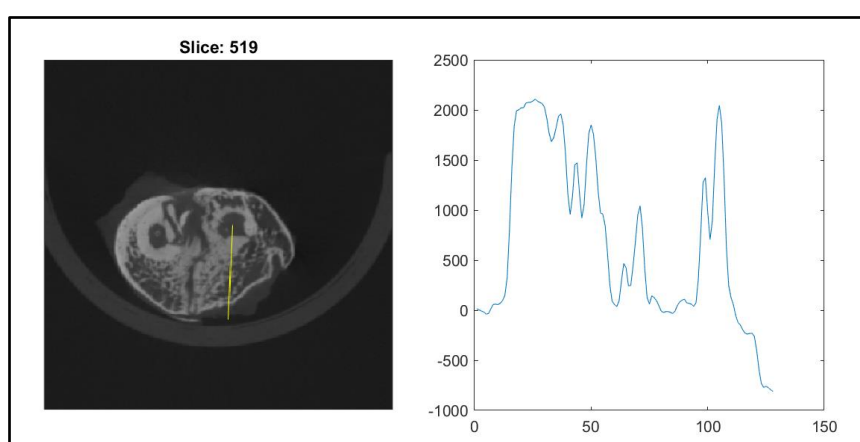


Fig 89. Estudio cortical en extremo de defecto creado

Tabla 10. Registro de medidas C10

Pixel size (m		0,058													
id	Study name	ROI position	ROI size -X Y	BV(px)	TV(px)	BV/TV	Threshold	Radio	ROI trabecul	ROI cortical	Tb.N	Tb.Th(mm)	Tb.Sep(mm)	Cortical.Th(n	
0	CT_594547_i	436	108.8531	1	1509	1820	0,82912088	86,803992	3	180.5054	200.8158	64	0,02816824	1,76812121	0,29093548
1	CT_594547_i	519	121.7719	129.1404	466.6667	466.6667					374.1404	368	349.5789	476.0702	5,47013341
2	CT_594547_i	519	121.7719	129.1404	466.6667	466.6667					402.386	380.2807	299.2281	342.2105	1,65566656
3	CT_594547_i	219	116.2456	137.7368	466.6667	466.6667					263	298.614	337.2983	374.1404	1,23164089
4	CT_594547_i	219	116.2456	137.7368	466.6667	466.6667					320.7193	320.7193	403.614	446.5965	1,24624649
5	CT_594547_i	350	303.8759	2	392013	1587060	0,24700578								
6	CT_594547_i	350	285.7517	1	2308065	7351930	0,31394001								

CASO C1

Datos: Tatuaje H1062. Grupo B+C. 6 semanas.

Volumen de hueso en el área a estudio: BV/TV

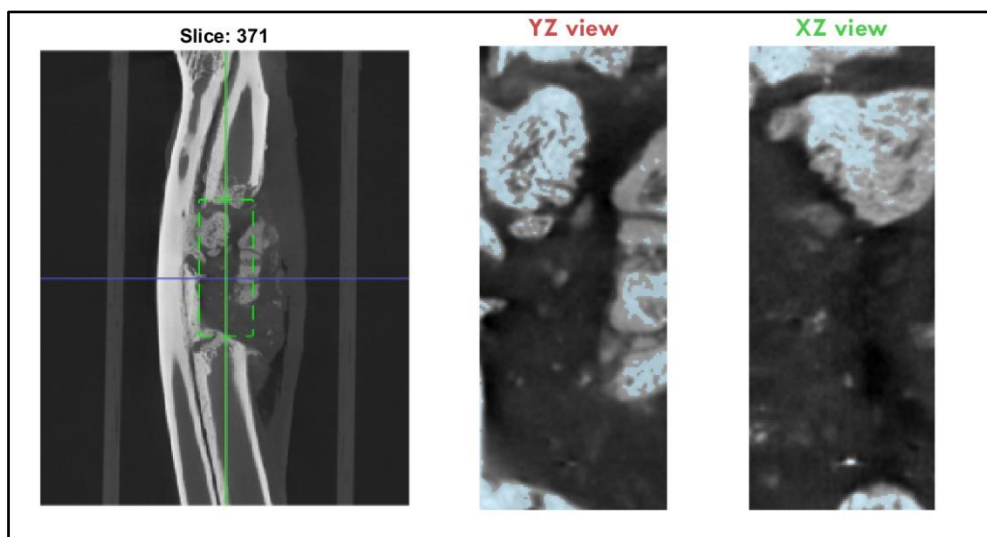


Fig 90. BV/TV ROIp

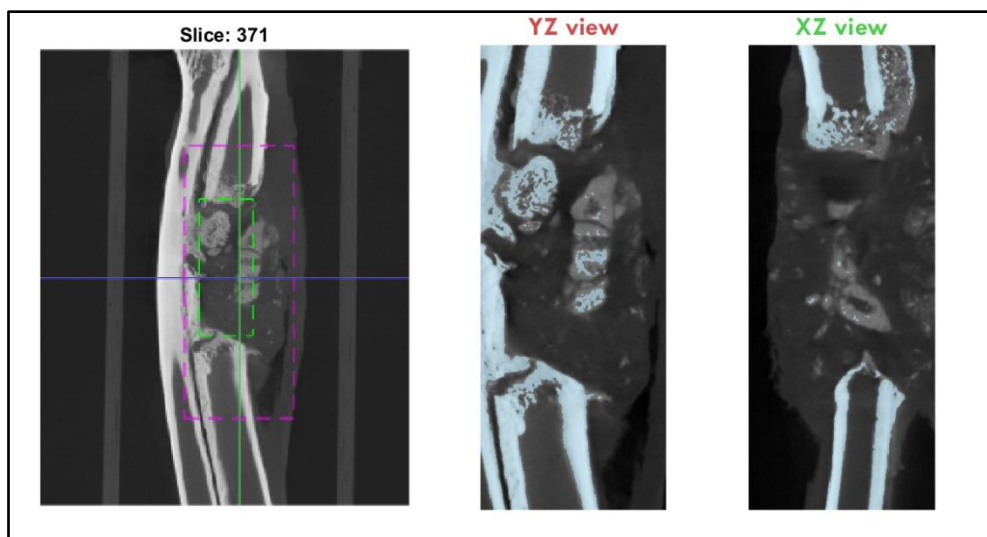


Fig 91. BV/TV ROIg

Estudio trabecular

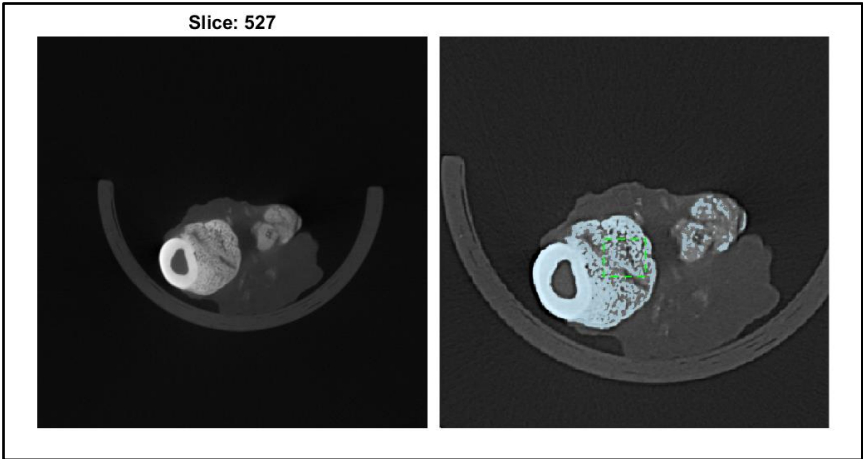


Fig 92. Corte axial estudio trabecular con y sin contraste.

Estudio cortical

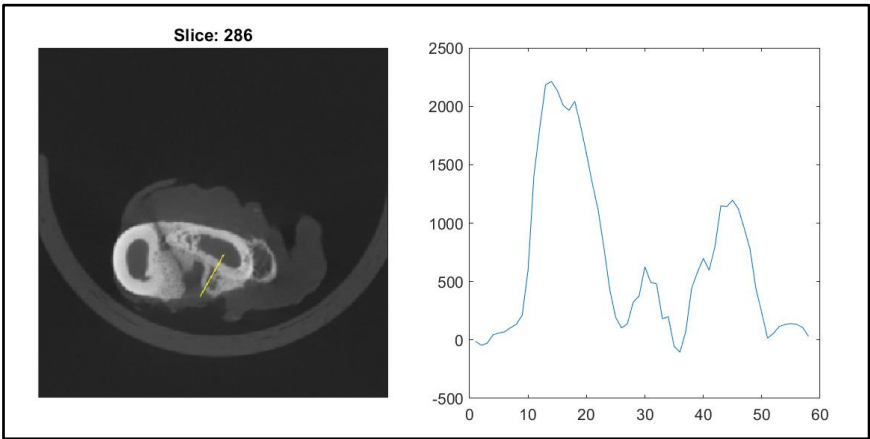


Fig 93. Estudio cortical en extremo de defecto creado

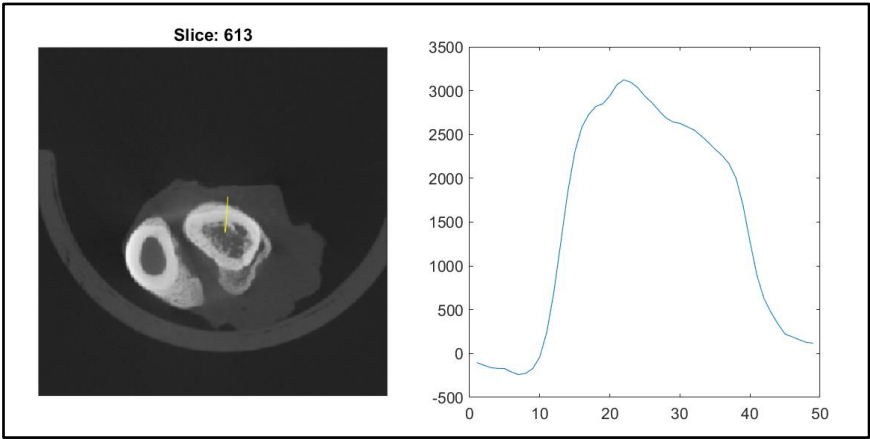


Fig 94. Estudio cortical en extremo de defecto creado

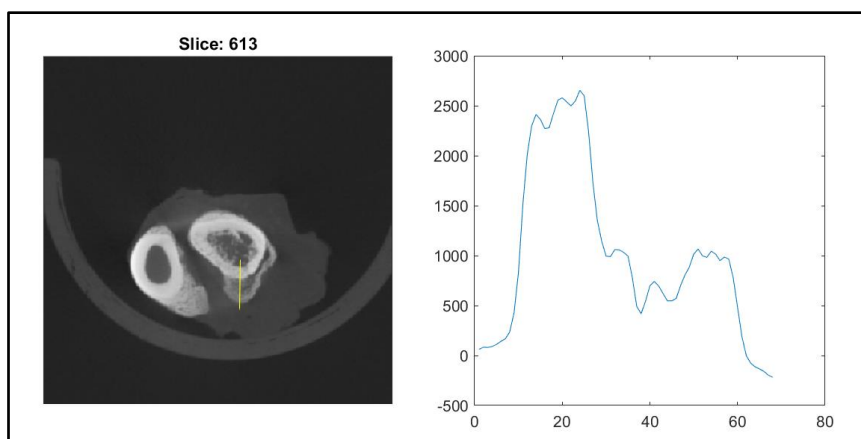


Fig 95. Estudio cortical en extremo de defecto creado

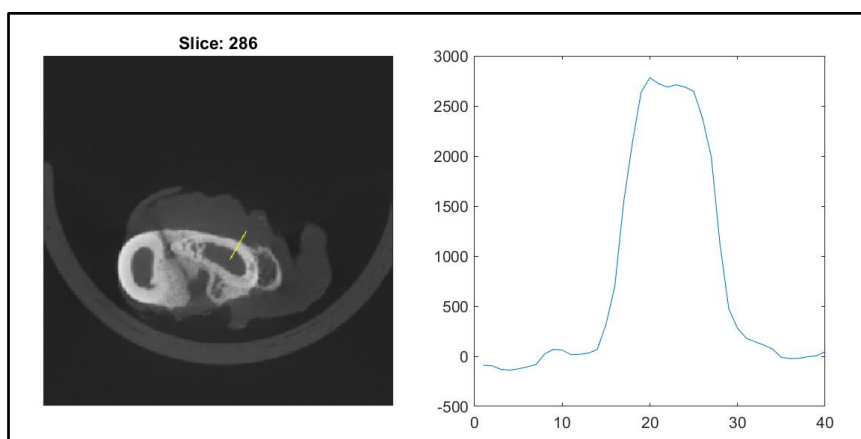


Fig 96. Estudio cortical en extremo de defecto creado

Tabla 11. Registro de medidas CI

Pixel size (m 0,058)															
id	Study name	ROI position	ROI size - X Y	BV(px)	TV(px)	BV/TV	Threshold	Radio	ROI trabecul	ROI cortical	s Tb.N	Tb.Th(mm)	Tb.Sep(mm)	Cortical.Th(n)	
0	CT_1062_id_	527	107.1904	1	951	1932	0,49223602	125,635893	3	177.5125	218.2754	45	0,06612485	0,4377619	0,4393668
1	CT_1062_id_	613	116.2456	118.7018	466.6667	466.6667					379.6667	378.4386	391.9474	458.2632	2,91710999
2	CT_1062_id_	613	116.2456	118.7018	466.6667	466.6667					369.8421	366.1579	318.2632	366.1579	1,71639441
3	CT_1062_id_	286	120.5439	116.8596	466.6667	466.6667					368.336.0702	392.5614	449.0526		2,27664987
4	CT_1062_id_	286	120.5439	116.8596	466.6667	466.6667					391.3333	369.2281	350.807	388.8772	0,76029834
5	CT_1062_id_	371	301.0759	3	361523	2834828	0,12752908								
6	CT_1062_id_	371	274.5517	1	2871489	16349470	0,17563193								

CASO C9

Datos: Tatuaje H51328. Grupo B+C+O. 12 semanas.

Volumen de hueso en el área a estudio: BV/TV

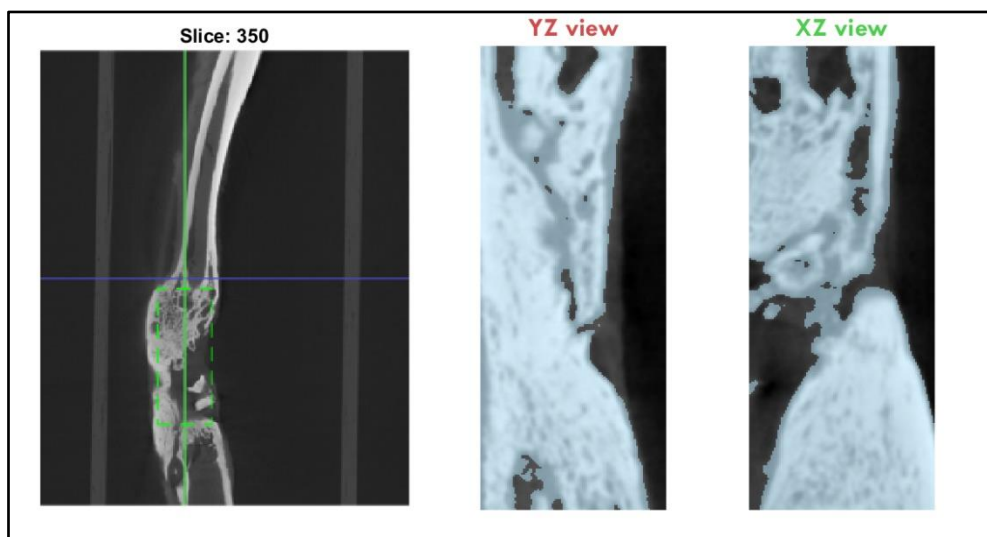


Fig 97. BV/TV ROIp

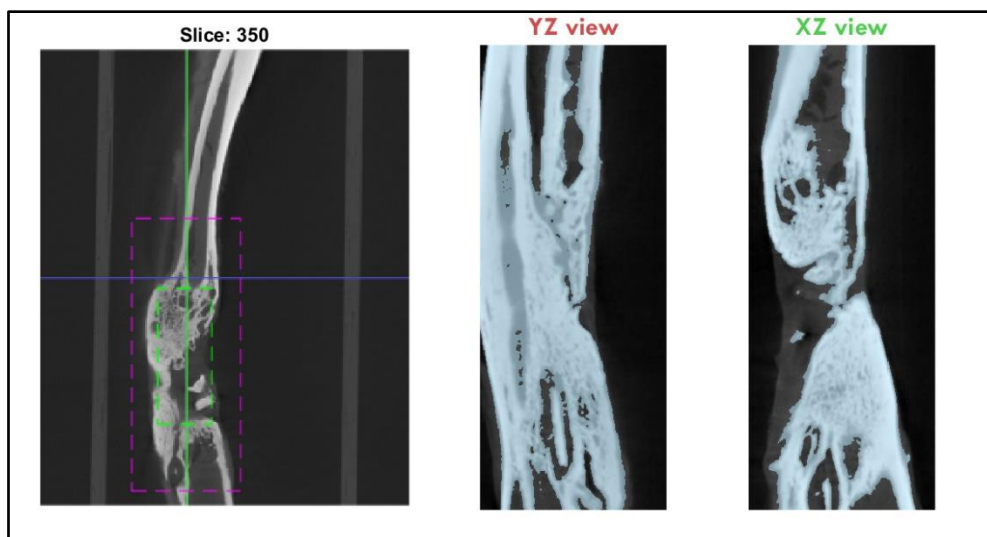


Fig 98. BV/TV ROIg

Estudio trabecular

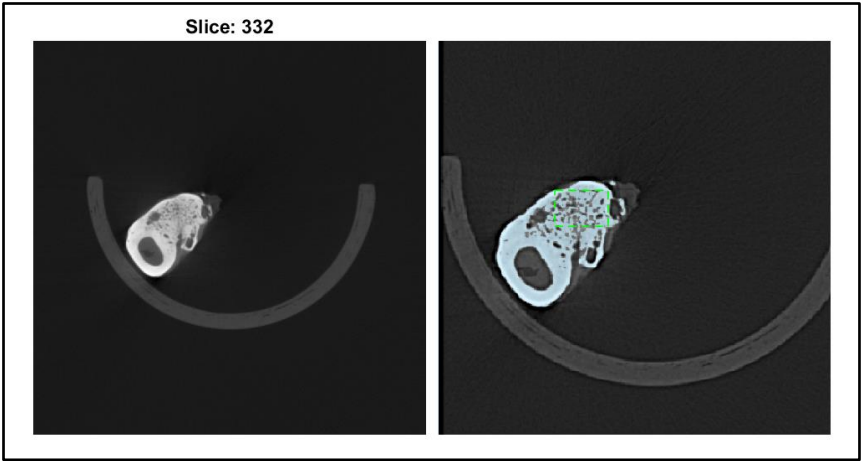


Fig 99. Corte axial estudio trabecular con y sin contraste

Estudio cortical

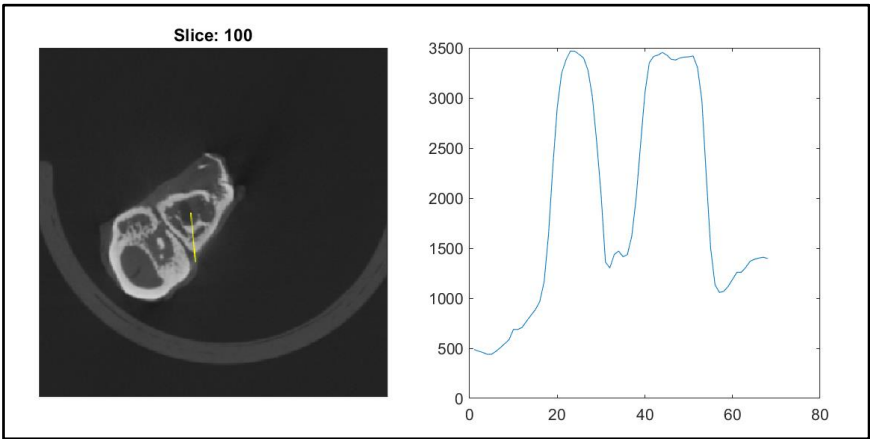


Fig 100. Estudio cortical en extremo de defecto creado

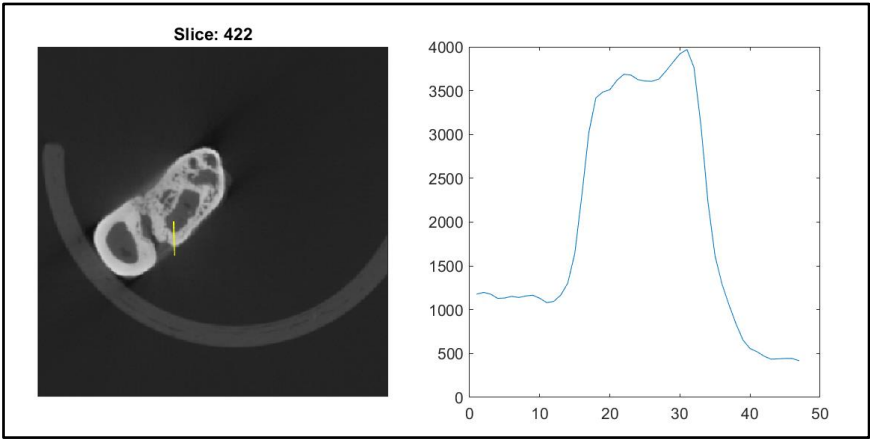


Fig 101. Estudio cortical en extremo de defecto creado

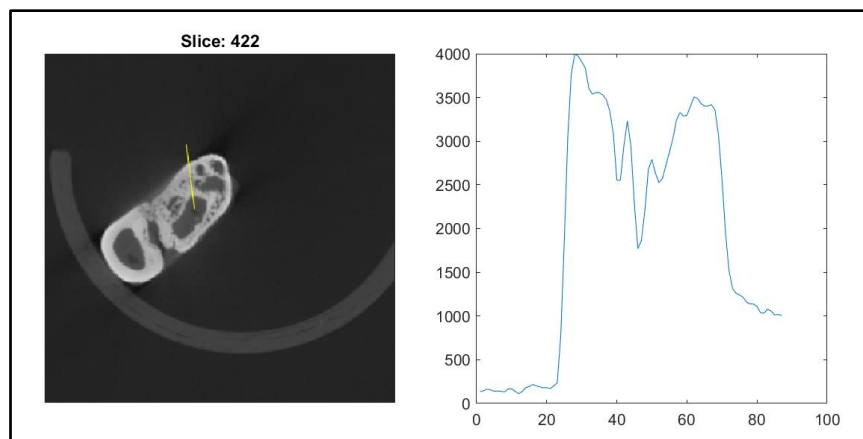


Fig 102. Estudio cortical en extremo de defecto creado

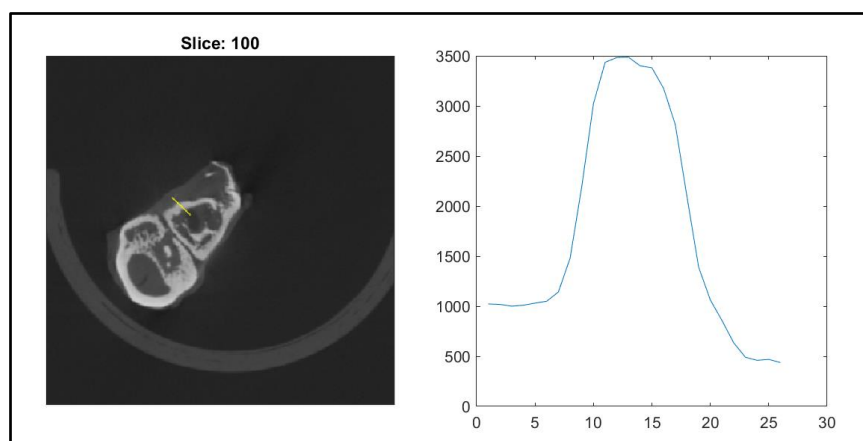


Fig 103. Estudio cortical en extremo de defecto creado

Tabla 12. Registro de medidas C9

Pixel size (m 0,058)															
id	Study name	ROI position	ROI size -X Y	BV(px)	TV(px)	BV/TV	Threshold	Radio	ROI trabecul	ROI cortical	Tb.N	Tb.Th(mm)	Tb.Sep(mm)	Cortical.Th(n	
0	CT_51328_id	332	97.76841	1	1401	2262	0,6193634	140	3	125.636	159.9132	56.9	0,05724	0,64876647	0,36451095
1	CT_51328_id	422	91.07018	111.3333	466.6667	466.6667					279.579	290.6316	233.5263	319.4912	2,73135865
2	CT_51328_id	422	91.07018	111.3333	466.6667	466.6667					272.2105	273.4386	345.2807	390.7193	1,14045383
3	CT_51328_id	100	101.5088	91.68421	466.6667	466.6667					304.7544	310.8947	312.1228	378.4386	2,10631149
4	CT_51328_id	100	101.5088	91.68421	466.6667	466.6667					270.3684	294.9298	281.4211	304.7544	0,62478315
5	CT_51328_id	350	222.6759	1	1658533	2812160	0,58977192								
6	CT_51328_id	350	173.7517	2	5749659	22410596	0,25655984								

Tras realizar la adquisición de todas las imágenes y variables de la manera expuesta previamente, realizamos un análisis dependiente del tiempo, así como un análisis según tipo de material implantado.

○ Análisis dependiente del tiempo

A continuación, se representan el análisis de los parámetros óseos de todos los grupos analizados según el tiempo de seguimiento.

BS/TS

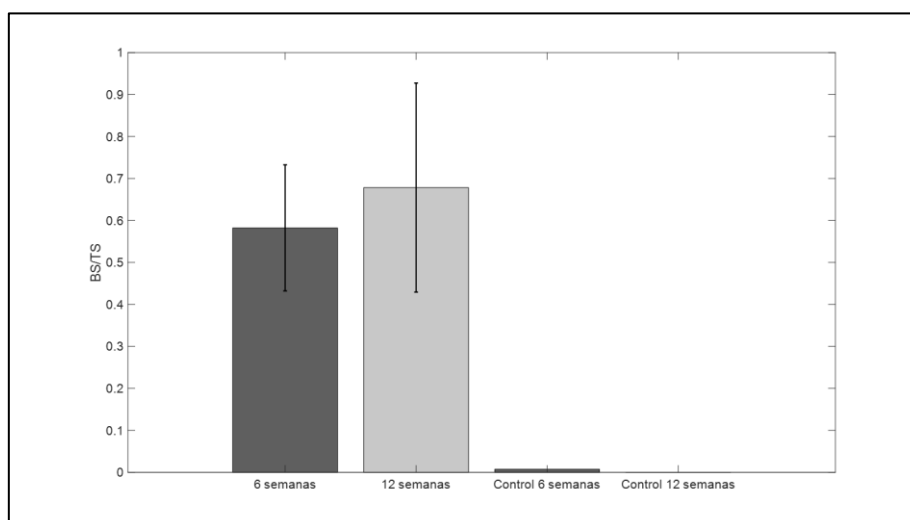


Fig 104. BS/TS por tiempos de seguimiento vs controles

En la figura 104, podemos observar cómo el aumento de volumen es prácticamente inexistente en los controles; de hecho, en el control de 12 semanas el cociente de aumento de hueso vale 0. Sin embargo, al analizar todos los grupos vemos como tanto para 6 como para 12 semanas la cifra del volumen total es mayor que en los controles, y esa cifra además aumenta con el tiempo de seguimiento.

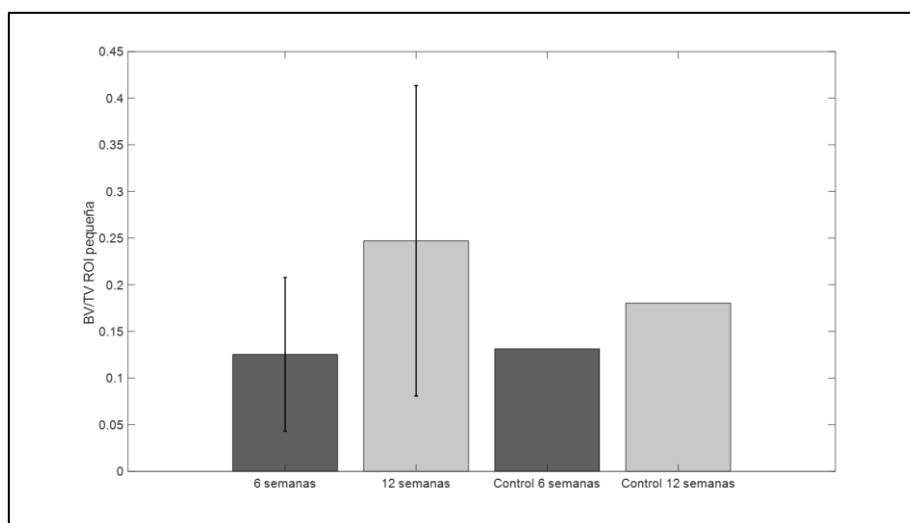
BV/TV ROI pequeña

Fig 105. BV/TV ROI_p por tiempos de seguimiento vs controles

Cuando estudiamos sólo el área del defecto creado, figura 105, los valores iniciales a las 6 semanas son parecidos a los del control. Sin embargo, estos aumentan al llegar a las 12 semanas de seguimiento. Este dato podría justificarse con la necesidad de un mayor tiempo de regeneración ósea en defectos críticos de gran tamaño.

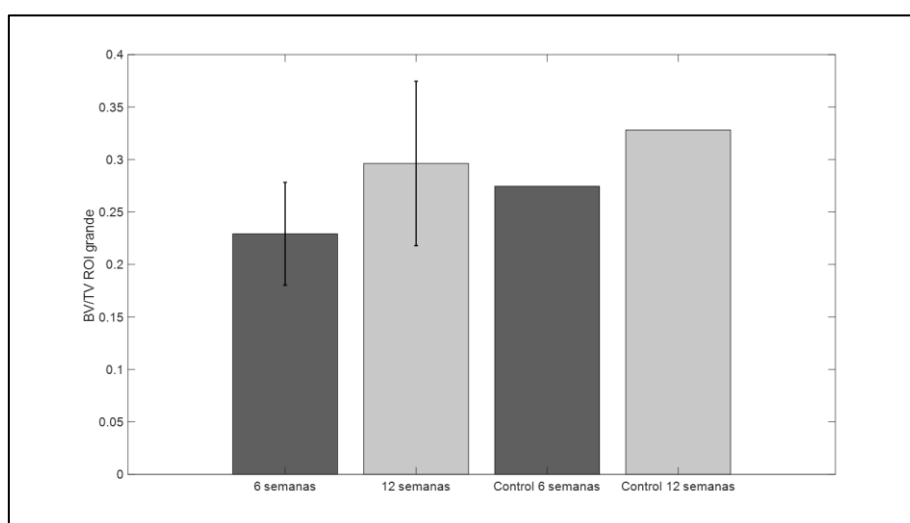
BV/TV ROI grande

Fig 106. BV/TV ROI_g por tiempos de seguimiento vs controles

Los valores de 6 y 12 semanas cuando cambiamos la ROI para evitar sesgos de medición del defecto, siguen aumentando con el tiempo. Sin embargo, al incluir hueso sano, se asemejan más a los controles. El material, en muchas de las piezas, produce una reacción ósea en los bordes del defecto que se incluyen en esta ROI, de ahí el aumento de todos los valores representados.

Número trabecular (mm^{-1})

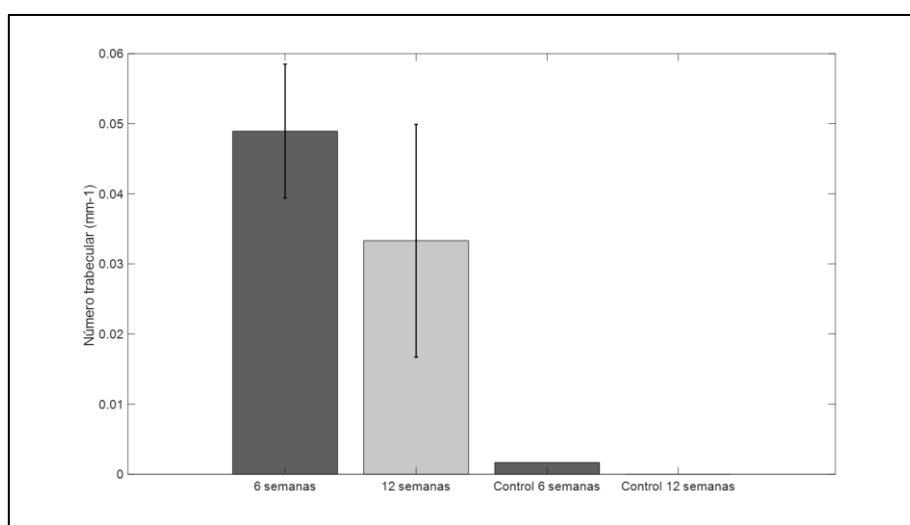


Fig 107. TbN por tiempos de seguimiento vs controles

Tanto para 6 como para 12 semanas el número aumenta y en ambos casos, es mayor que en los controles. A las 12 semanas el número trabecular del grupo control vale 0. Sin embargo, vemos como el valor es menor a las 12 semanas.

Este hecho quizá podría tener relación con el proceso de remodelado en el que el hueso formado se vuelve más compacto y, por tanto, podría disminuir el número de trabéculas y su separación o que su medición fuera más imprecisa.

Grosor cortical

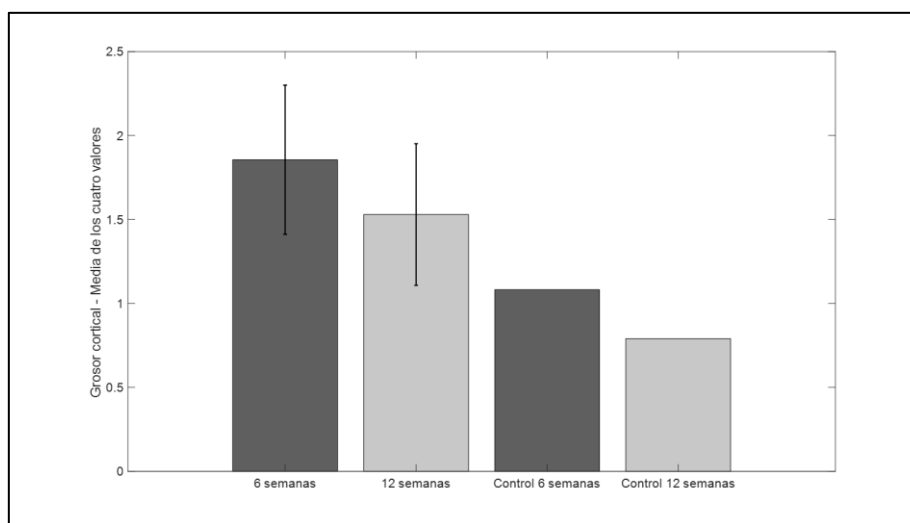


Fig 108. CtTh por tiempos de seguimiento vs controles

Los valores de la media de las medidas corticales a ambos lados del defecto creado aumentan tanto a las 6, como a las 12 semanas. Sin embargo, puede que el cálculo de la media con 2 medidas por extremo nos lleve al error de obtener más grosor en las medidas de la semana 6, que como se puede apreciar son mayores que los de la semana 12.

Para entender este dato, realizamos el análisis dividido entre los dos extremos óseos del defecto a nivel proximal y distal.

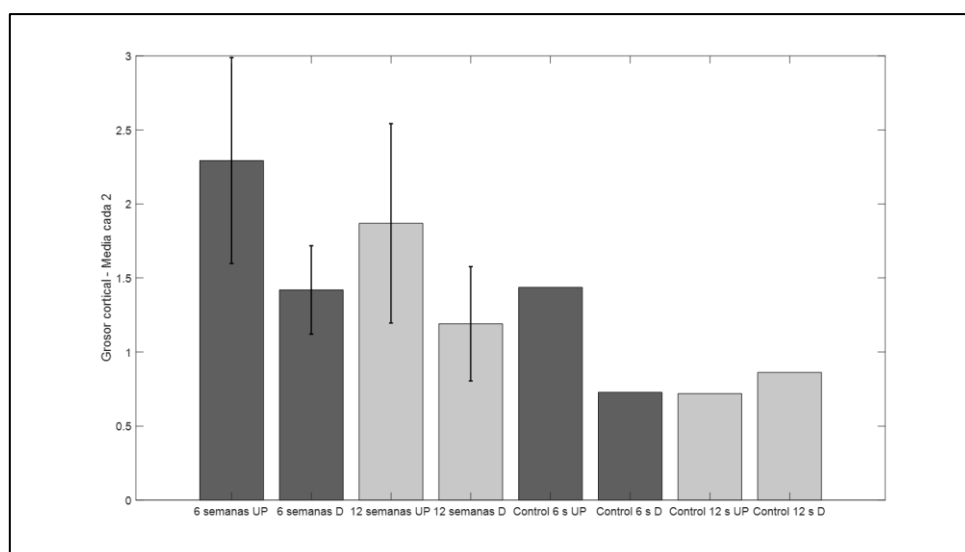


Fig 109. CtTh media entre los valores proximales y distales por separado

Los valores tanto a las 6 como a las 12 semanas siguen aumentando, pero seguimos observando como son mayores en la semana 6 que en la 12. Sucede como en el caso anterior.

Además, parece que el cociente del grosor cortical de la parte proximal es mayor que el distal, dato que consideramos un hallazgo casual.

○ **Análisis por grupos**

A continuación, se representa en las próximas figuras el análisis de los parámetros óseos dividido por grupos de estudio y tiempo de seguimiento.

BS/TS

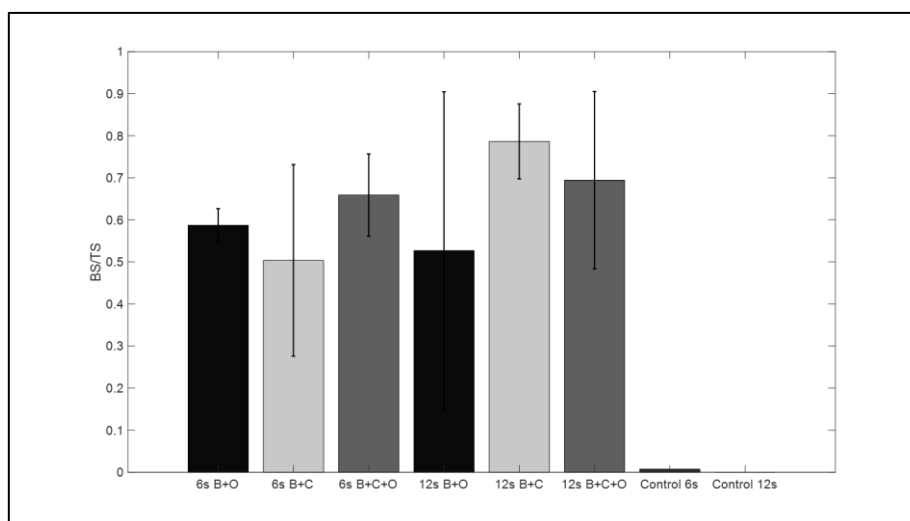
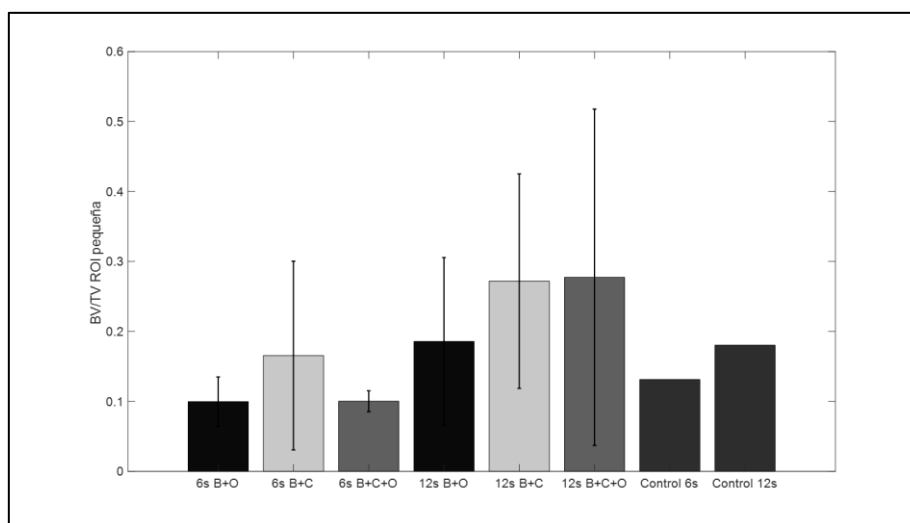
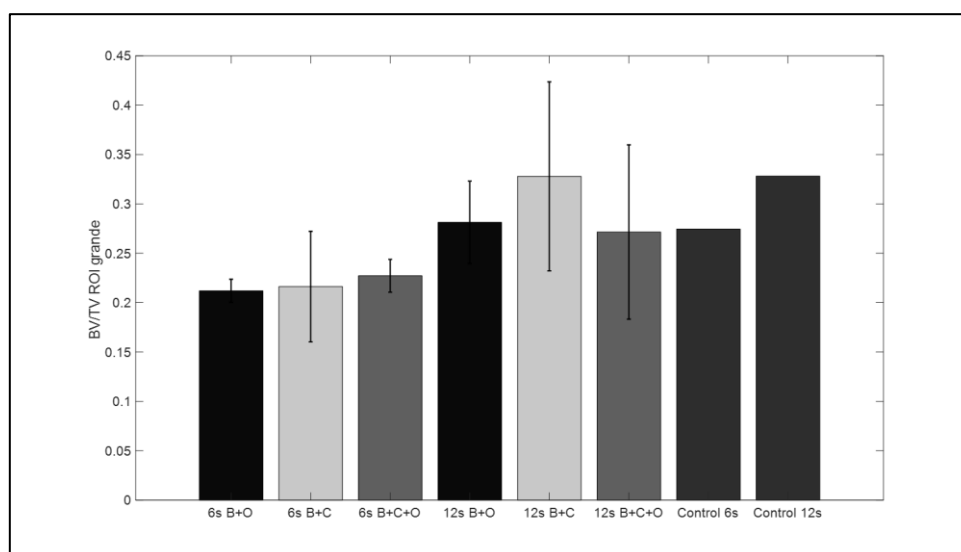


Fig 110. BS/TS por grupos y tiempos de seguimiento

Tanto para 6 como para 12 semanas los valores en los tres grupos de estudio aumentan y son mayores que en los controles. El que tiene mayor BS/TS a las 6 semanas es el grupo B+C+O, mientras que a las 12 semanas es el de B+C. También observamos individualmente un aumento de volumen entre las 6 y 12 semanas en todos los grupos a excepción del grupo B+O, que parece que presenta una disminución del valor a las 12 semanas.

BV/TV ROI pequeña*Fig 111. BV/TV por grupos y tiempos de seguimiento*

Centrándonos en el defecto, a las 6 semanas observamos cómo los valores de BV/TV aumentan en todos los grupos, pero son similares respecto al control, más en los grupos B+O y B+C+O. A las 12 semanas todos presentan un aumento de este valor, que en este caso sí supera a los encontrados en los controles.

BV/TV ROI grande*Fig 112. BV/TV por grupos y tiempos de seguimiento*

Al igual que en las medidas previas en el análisis por tiempo, el añadir superficie ósea sana nos lleva a la semejanza en los datos, tanto entre grupos como respecto a los controles.

Número trabecular (mm-1)

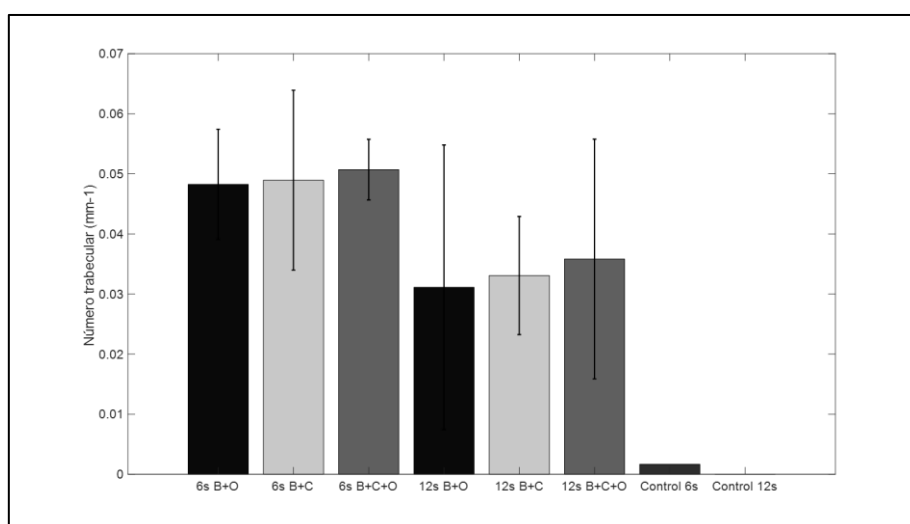


Fig 113. TbN por grupos y tiempos de seguimiento

En todos los grupos observamos un aumento del número trabecular respecto a los controles. Este valor vuelve a ser inferior a las 12 semanas.

Grosor cortical

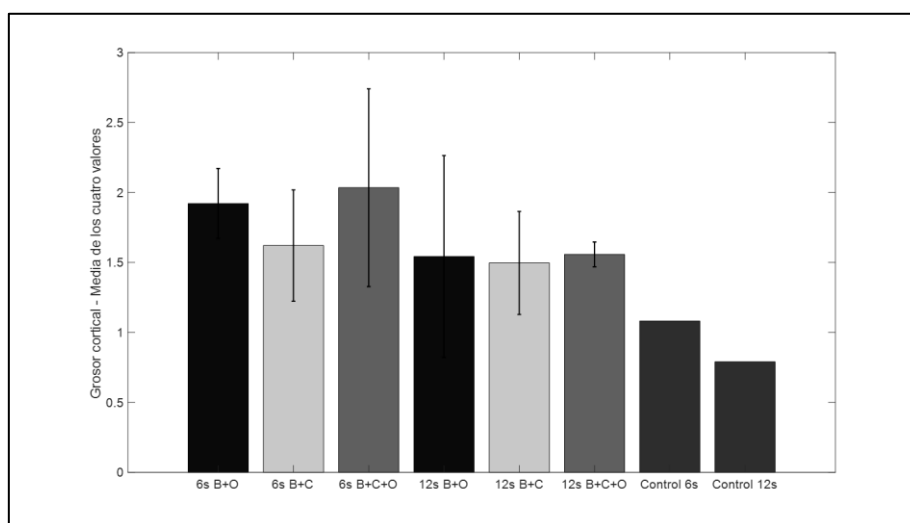


Fig 114. CtTh por grupos y tiempos de seguimiento

El grosor cortical medio, aumenta en todos los grupos. Más en el grupo de B+C+O en ambos tiempos de seguimiento.

CtTh medio entre los valores superiores y los inferiores por separado

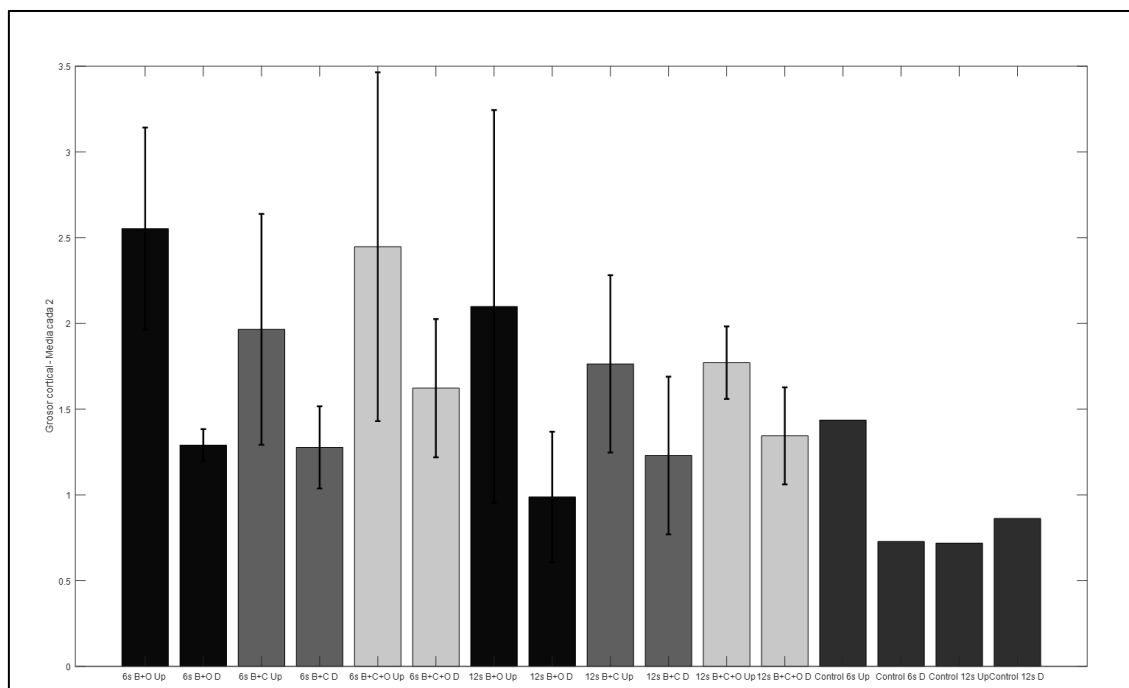


Fig 115. CtTh por grupos y tiempos de seguimiento

Los valores de 6 y 12 semanas siguen siendo mayores que los del control, mayores en la semana 6 y en los extremos proximales que en los distales.

5.3.2 Resumen de resultados de análisis de imagen

- Hay un claro aumento de volumen total de hueso en todos los grupos y en ambos tiempos de seguimiento. Este valor, como era esperable, es mayor a las 12 semanas. Los grupos con mejores resultados son el de B+C+O y B+C. Este hecho podría tener relación con la presencia de las células como señal osteogénica.
- El valor de la presencia y separación trabecular aumenta en todos los grupos. Encontramos que a las 12 semanas es menor que a las 6. Es posible que haya más trabéculas a las 6 semanas y a medida que avanzamos en el tiempo éstas disminuyan

dando lugar a un hueso más compacto y por eso su valor sea menor o sean más difíciles de cuantificar.

- El grosor cortical aumenta en todos los grupos, más a las 6 semanas de seguimiento y en los casos con B+C+O. La explicación puede tener relación con el remodelado óseo que tiene lugar en el hueso a medida que pasan las semanas para conseguir la consolidación. El hecho de ser mayor en el grupo con más señales añadidas coincide con el planteamiento de presentar una mejor respuesta osteoinductora y osteoconductora.

5.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se ha realizado llevando a cabo las comparaciones entre los parámetros óseos medidos entre los tres grupos estudiados y respecto a los dos tiempos de seguimiento, 6 y 12 semanas, en cada uno de ellos. Al haber sólo un control por tiempo, no se pueden comparar los grupos con dicho control, pero obviamente hay un aumento en todos los parámetros de todos los grupos estudiados respecto al mismo.

El planteamiento de los parámetros estudiados respecto a nuestra hipótesis inicial lo mostramos en la siguiente tabla.

Tabla 13: Hipótesis inicial respecto a los valores de medición ósea

BT/TV: bone volume/tissue volume	Mayor será la regeneración/formación ósea cuanto mayor sea este parámetro.
Tb.Th: trabecular thickness	Mayor será la regeneración/formación ósea cuanto mayor sea este parámetro.
Tb.N: trabecular number	Mayor será la regeneración/formación ósea cuanto mayor sea este parámetro.
Tb.Sep: trabecular separation	Mayor será la regeneración/formación ósea cuanto menor sea este parámetro.
Cortical Th: cortical thickness	Mayor será la regeneración/formación ósea cuanto mayor sea este parámetro.

5.4.1. Análisis estadístico detallado por tiempos y grupos

Para el análisis comparativo de los valores de los parámetros óseos medidos en los tres grupos de estudio se empleó el test no paramétrico de Kruskal Wallis para muestras independientes con el factor de corrección de Dunn.

Para la comparación dentro de cada grupo de dichos valores óseos con respecto al tiempo de seguimiento empleamos el test no paramétrico U de Mann Whitney.

En todos los casos, como grado de significación estadística se consideró un valor de $p < 0,05$.

Tiempo de seguimiento: 6 semanas

En los datos obtenidos observamos:

- Tendencia no significativa en el aumento del BV/TV de los grupos B+O y B+C+O vs B+C.
- Aumento significativo del Tb.Th de los grupos B+O y B+C+O vs B+C.
- Tendencia no significativa en la disminución del Tb. Sep de los grupos B+O y B+C+O vs B+C.
- Tendencia no significativa en el aumento del Tb.N de los grupos B+O y B+C+O vs B+C.
- Aumento significativo del Cortical.Th del grupo B+C+O comparado con B+C. Tendencia no significativa del grupo B+O vs B+C.

Los datos se representan en las tablas 14 a 18 y en las figuras 116 a 120.

Tabla 14. Comparación BV/TV

	BV/TV	SD	Error	Statistics
Control	0,00750208	0	0	
B+C	0,155919439	0,1069184	0,04781536	
B+O	0,243873835	0,06452533	0,03226267	0,235787645
B+C+O	0,227210275	0,01661989	0,00830994	0,482341876

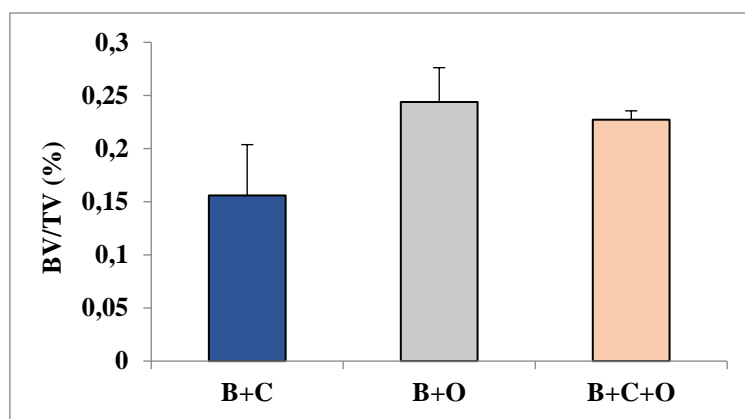


Fig 116. Representación gráfica de la comparación BV/TV

Tabla 15. Comparación Tb.Th.

	Tb.Th(mm)	SD	Error	Statistics
Control	0,136173913	0	0	
B+C	0,412425227	0,11781816	0,05890908	
B+O	0,762056982	0,09687957	0,04332586	0,002486568
B+C+O	0,791961121	0,19979969	0,08935314	0,035176885

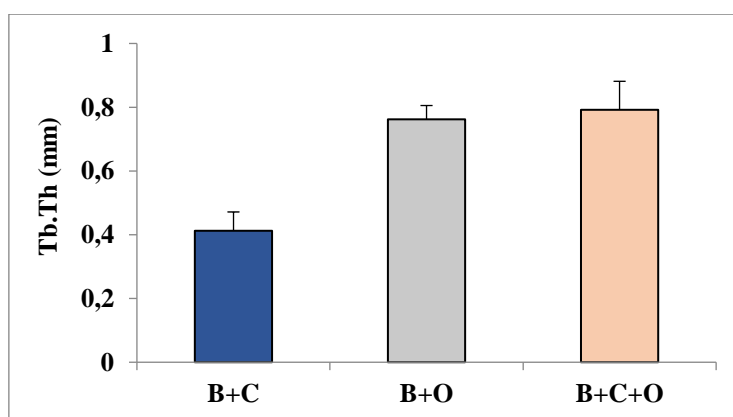


Fig 117. Representación gráfica de la comparación Tb.Th.

Tabla 16. Comparación Tb.Sep.

	Tb.Sep(mm)	SD	Error	Statistics
Control	34,52933333	0	0	
B+C	0,617453108	0,35038625	0,08759656	
B+O	0,478293271	0,11796209	0,04815782	0,400243857
B+C+O	0,394245333	0,10842133	0,04426282	0,506785567

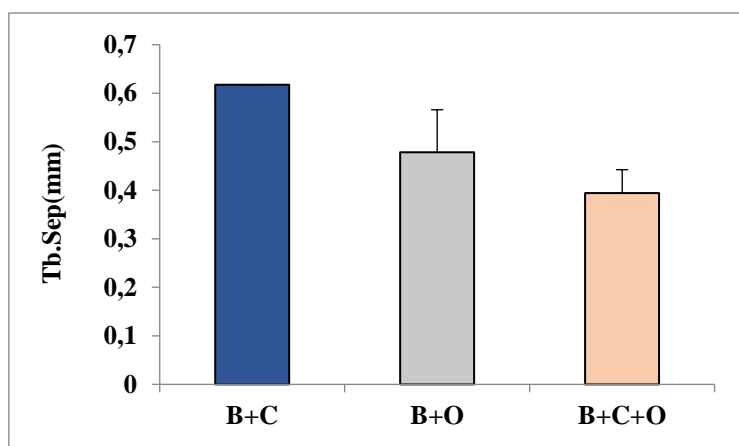


Fig 118. Representación gráfica de la comparación Tb.Sep.

Tabla 17. Comparación Tb.N.

	Tb.N	SD	Error	Statistics
Control	0,001673133	0	0	
B+C	0,04321737	0,0096443	0,00482215	
B+O	0,051738924	0,00525821	0,00214665	0,081103345
B+C+O	0,050703586	0,00412039	0,00168214	0,199853224

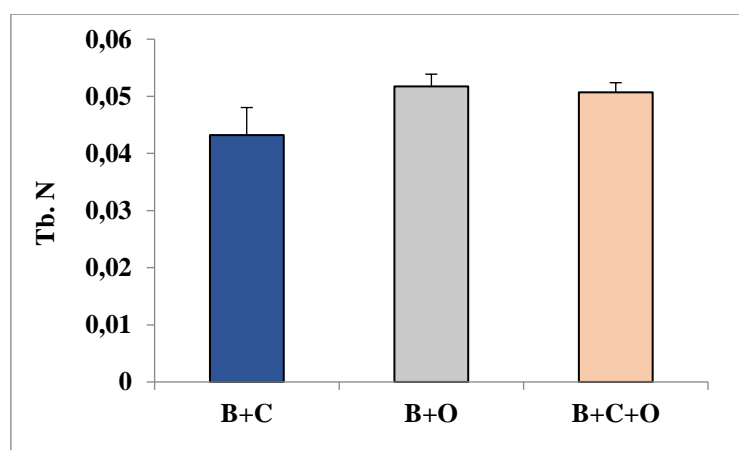


Fig 119. Representación gráfica de la comparación Tb.N.

Tabla 18. Comparación Cortical Th.

	Cortical.Th(mm)	SD	Error	Statistics
Control	0,758902252	0	0	
B+C	1,620986379	0,8188933	0,20472332	
B+O	1,956743708	0,90539871	0,22634968	0,114255786
B+C+O	2,263638898	0,82289708	0,20572427	0,042556331

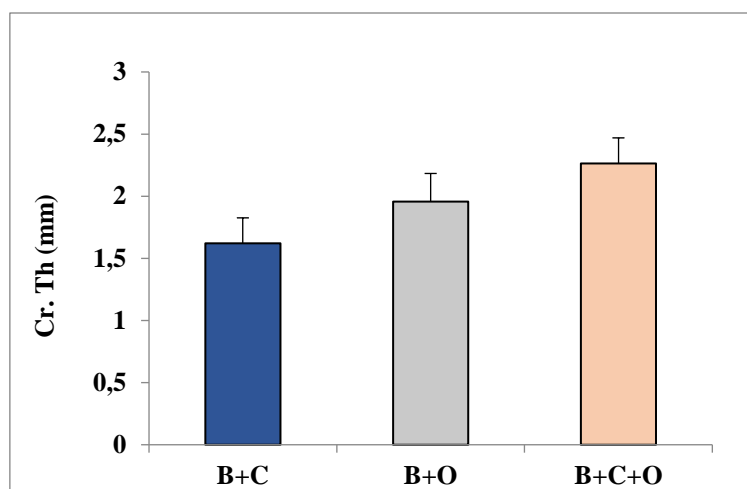


Fig 120. Representación gráfica de la comparación Cortical Th.

Tiempo de seguimiento: 12 semanas

En los datos observamos:

- Aumento significativo en el BV/TV del grupo B+C+O vs B+C. Tendencia no significativa en el aumento del grupo B+O vs B+C.
- Aumento significativo del Tb.Th del grupo B+C+O vs B+C. Tendencia no significativa en el aumento del Tb.Th del grupo B+O vs B+C.
- Tendencia no significativa en la disminución del Tb.Sep de los grupos B+O y B+C+O vs B+C.
- Aumento significativo en el Tb.N del grupo B+C+O vs B+C. Tendencia no significativa del grupo B+O vs B+C.
- Aumento significativo del Cortical.Th de los grupos B+O y B+C+O vs B+C.

Los resultados se representan en las tablas 19 a 23 y en las figuras 121 a 125.

Tabla 19. Comparación BV/TV

	BV/TV	SD	Error	Statistics
Control	0,180364097	0	0	
B+C	0,233926141	0,03655458	0,01492334	
B+O	0,281334094	0,04176614	0,01705095	0,091224891
B+C+O	0,365990946	0,13902331	0,05675603	0,020114578

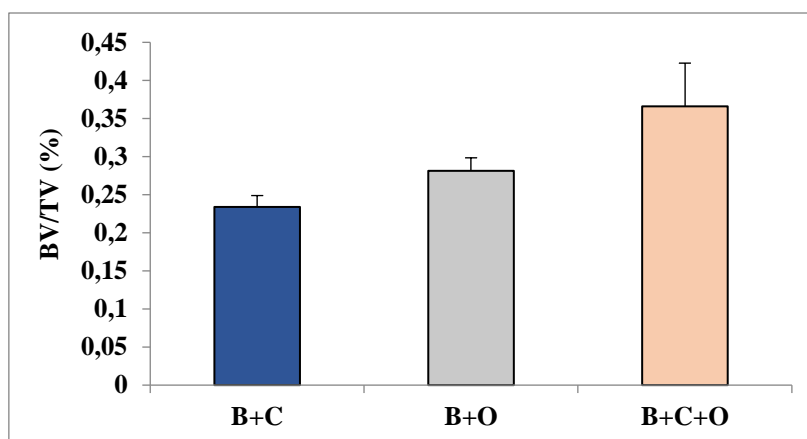


Fig 121. Representación gráfica de la comparación BV/TV

Tabla 20. Comparación Tb.Th.

	Tb.Th(mm)	SD	Error	Statistics
Control	0	0	0	
B+C	1,198279497	0,32286067	0,13180732	
B+O	1,472374599	0,29574661	0,14787331	0,281866334
B+C+O	2,850792009	0,87374853	0,21843713	0,010214028

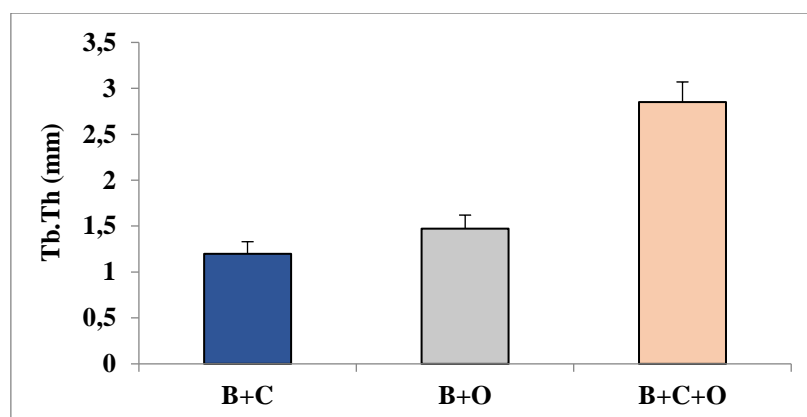


Fig 122. Representación gráfica de la comparación Tb.Th.

Tabla 21. Comparación Tb.Sep.

	Tb.Sep(mm)		Error	Statistics
Control	0	0	0	
B+C	0,332652188	0,0696297	0,03481485	
B+O	0,278674903	0,01226058	0,00613029	0,122358803
B+C+O	0,259588808	0,10492214	0,04283428	0,335968465

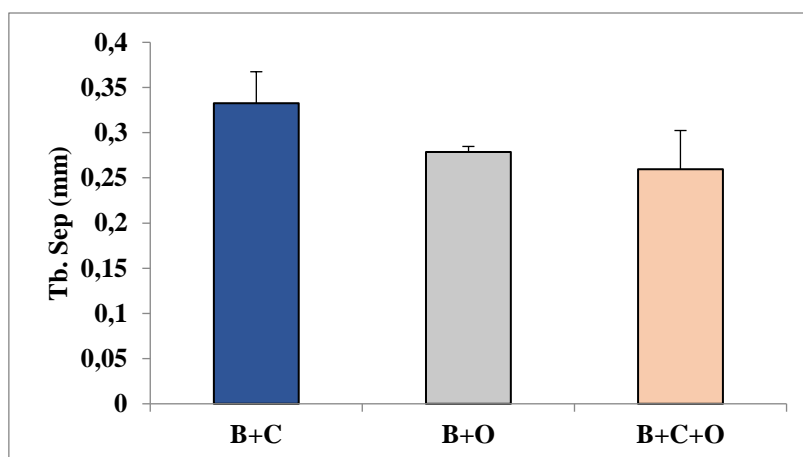


Fig 123. Representación gráfica de la comparación Tb.Sep.

Tabla 22. Comparación Tb.N.

	Tb.N.		Error	Statistics
Control	0	0	0	
B+C	0,033073275	0,00879221	0,0035894	
B+O	0,041484188	0,01143612	0,00571806	0,200129876
B+C+O	0,052506829	0,00473317	0,00236659	0,008978998

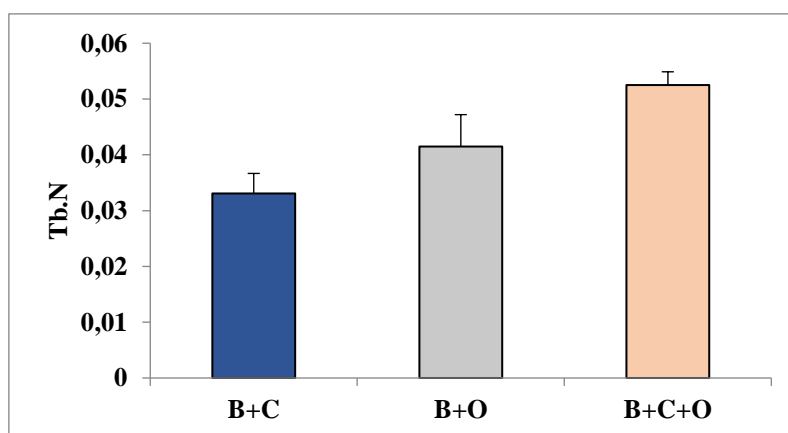


Fig 124. Representación gráfica de la comparación Tb.N.

Tabla 23. Comparación Cortical Th.

	Cortical.Th(mm)		Error	Statistics
Control	0,790540283	0,36994674	0,09248669	
B+C	1,496669498	0,77810493	0,19452623	
B+O	1,994986306	1,19526184	0,29881546	0,041224923
B+C+O	2,562646056	0,48163924	0,12040981	0,003661839

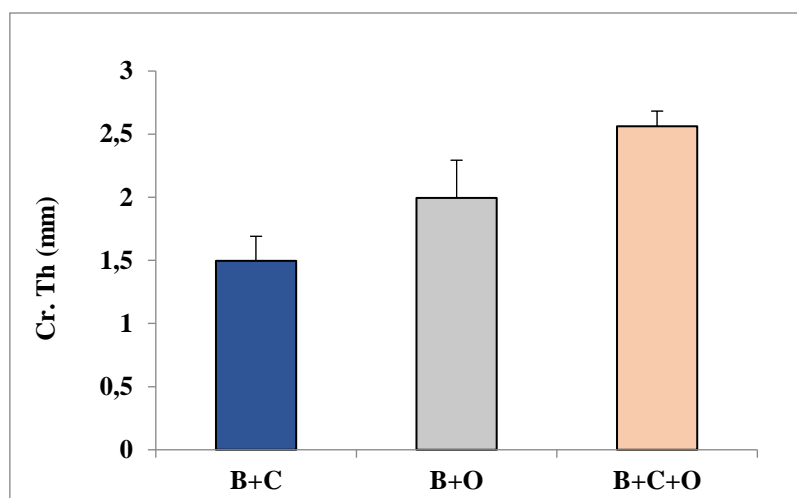


Fig 125. Representación gráfica de la comparación Cortical Th.

Los resultados en la comparación entre grupos de los parámetros de medición ósea indican que se encontraron 8 resultados significativos en diferentes parámetros trabeculares y corticales a las 6 y 12 semanas, siendo mayores en el caso de las 12 semanas. De estos 8 resultados significativos, 6 fueron en el grupo B+C+O vs B+C y 2 en el grupo B+O vs B+C.

Comparación 12 semanas vs 6 semanas

Los valores absolutos de todos los parámetros son mayores en el caso de las 12 semanas comparados con los de 6 semanas, cómo era previsible (tabla 24). Según avanza el tiempo, la regeneración y formación ósea es mayor y por lo tanto estos parámetros también (en el caso de la Tb.Sep disminuye, como también era esperable).

Los parámetros donde este cambio fue significativo son los siguientes:

- BV/TV: en el caso del grupo B+C+O.
- Tb.Th: en el caso de los tres grupos B+C, B+O y B+C+O.
- Tb. Sep: en el caso de B+O.

Tabla 24. Datos estadísticos 12 semanas vs 6 semanas

12 vs 6 semanas	
BV/TV	
B+C	0,45129678
B+O	0,25331043
B+C+O	0,01856563
Tb.Th(mm)	
B+C	0,001023512
B+O	0,001707528
B+C+O	0,005448632
Tb.Sep(mm)	
B+C	0,155213406
B+O	0,021478654
B+C+O	0,142236974
Tb.N.	
B+C	0,803459831
B+O	0,125479843
B+C+O	0,584654897
Cortical.Th(mm)	
B+C	0,499515436
B+O	0,687810299
B+C+O	0,659314674

5.4.2 Resumen de resultados estadísticos

- Podemos concluir que el grupo B+C+O es el grupo que induce una mayor formación y regeneración ósea en este estudio (sobre todo a las 12 semanas), con un mayor BV/TV, Tb.Th, Tb.N y grosor cortical. Es importante señalar que este efecto positivo significativo se produce tanto en hueso trabecular como en hueso cortical.
- En segundo lugar, con menos resultados significativos, pero con una tendencia positiva clara respecto al grupo B+C, se encuentra el grupo B+O.
- En tercer lugar, el grupo B+C es en el que se observa una menor regeneración ósea.

6. DISCUSIÓN

Para el tratamiento de los defectos óseos, un buen material debe proporcionar tres características básicas, osteogenicidad, osteoinducción y osteoconducción, y con esta base poder actuar como andamio para el crecimiento óseo, proporcionando estabilidad mecánica y porosidad suficiente para albergar moléculas en sus canales. Sus propiedades vendrán determinadas por su configuración tridimensional y su capacidad de reabsorción.

Sin embargo, cuando hablamos de defectos críticos, estas últimas cualidades, la estabilidad y la porosidad, se convierten en el caballo de batalla de cualquier investigador. Los pilares básicos descritos dentro del concepto de diamante y definidos por Giannoudis (Andrzejowski y Giannoudis, 2019), incluyen la presencia de células, factores de crecimiento para su diferenciación y una estructura donde se fijen, proliferen y se desarrollen esos componentes celulares; todo ello en un correcto entorno mecánico que proporcione estabilidad. En estos defectos no tendremos ni entorno estable, ni buena vascularización, ni estructura sobre la que generar hueso. Por ello, la búsqueda de materiales que cumplan con esas condiciones bien en forma de injertos o de sustitutos óseos no es sencilla. También Shors hablaba sobre esta idea cuando describía los tres requisitos de la "triada de osteoconducción": estabilidad, viabilidad y proximidad (Shors,1999).

Los defectos críticos suponen un profundo impacto clínico y económico, tanto por sus malos resultados funcionales como por las elevadas tasas de complicaciones y reintervenciones que presentan (Nauth et al, 2018). Añadido a esto, hay además una falta de consenso respecto a su definición y una ausencia de modelos reproducibles para la toma de decisiones que se basen en evidencias científicas. Hasta ahora, en la bibliografía encontramos pocos modelos animales con defectos críticos que cumplan con los criterios tal y como se definen. En general, un defecto mayor a 2 centímetros o que supere el cincuenta por ciento del diámetro del hueso en el que se produce se considera crítico. Pero esta definición depende en parte del hueso del que hablemos, de su localización y del estado de los tejidos que lo rodean (Reichert et al, 2009). De ahí la falta de consenso y de unificación de criterios. Y es que, en la reparación de estos defectos, factores

como la ubicación anatómica (diafisaria, metafisaria o articular), el entorno de los tejidos blandos o la carga a la que estén sometidos, van a influir de forma decisiva en la capacidad de reparación de los mismos. Por eso, uno de nuestros objetivos era definir un modelo de defecto crítico correcto, en el hueso y animal adecuados. El conejo cumplía con los requisitos por su tamaño y su recambio óseo, tres veces más rápido que el humano, pero muy parecido en sus procesos de reparación. Necesitábamos un hueso largo que soportara un defecto diafisario de tales características y, si era posible, sin necesitar fijación. En estudios previos como el de Haines, se demuestra cómo la ubicación anatómica es clave en la evolución; defectos de menor tamaño en la tibia tenían peores resultados que defectos mayores y a priori con peor pronóstico en el fémur (Haines et al, 2016). Respecto a esa ubicación, necesitábamos tener en cuenta también que los huesos están sometidos a cargas que hacen que sea imprescindible que el sustituto presente una alta resistencia mecánica, tanto a la compresión como a la tracción. Estas propiedades son necesarias hasta que el tejido regenerado posea suficiente resistencia por sí mismo (Gugala y Gogolewski, 1999). Considerando la sinostosis fisiológica que presentan los conejos entre radio y cúbito y que el apoyo es mayor en las patas traseras, la elección de la ubicación estaba clara, evitando así inmovilizaciones, fijaciones y una carga excesiva. Nuestro defecto cumplía con los requisitos estándar descritos en trabajos similares. Así lo podíamos confirmar en una de las revisiones más amplias sobre regeneración ósea en modelos animales donde encontrábamos estudios con defectos segmentarios y críticos de 15 a 20 mm en cúbito de conejo o de 14 mm en tibia (Mills y Simpson, 2012).

Una vez definido y validado nuestro modelo de defecto, la selección del tratamiento debía basarse en las características del mismo. La reconstrucción de los defectos óseos la podemos realizar con una variedad de estrategias que incluyen la utilización de injerto óseo de cresta ilíaca autógena, injerto óseo procedente de RIA, sustitutos de injerto óseo, hueso obtenido mediante técnicas de transporte o cualquier combinación de estas. En esa búsqueda del sustituto ideal, el patrón oro hasta ahora ha sido el injerto de cresta ilíaca. Pero existen numerosos inconvenientes del injerto óseo autógeno, principalmente la limitación de su disponibilidad. Respecto a este último punto, encontramos la misma desventaja con el injerto procedente de RIA. Entre los sustitutos sintéticos,

las BMP también han demostrado una efectividad reducida y un aumento significativo de posibles complicaciones principalmente por el desconocimiento de sus concentraciones ideales para evitar efectos deletéreos en el organismo. Esas complicaciones parecen ser dosis dependientes y de momento se necesita más investigación para determinar los sistemas de administración óptimos y la dosificación precisa para ampliar su uso seguro.

Las limitaciones principales, por tanto, se deben a que los biomateriales y sustitutos actuales presentan una disponibilidad reducida; poca capacidad para promover la regeneración y sustituirse por tejido resultante; una logística para la producción celular autóloga compleja; un proceso lento en cuanto a la combinación célula y material para conformar el producto final y obtener la autorización de las agencias regulatorias y unas propiedades biomecánicas escasas para soportar las cargas necesarias en grandes defectos óseos.

En este campo y en los últimos años nuestro grupo de investigación ha desarrollado los vidrios mesoporosos, biocerámicas que generan la respuesta *in vitro* más rápida descrita por un biomaterial y que presentan un elevado volumen de poros y canales para albergar moléculas osteogénicas (Gómez-Cerezo et al, 2015; Vallet-Regí, 2019). El potencial regenerativo de estos vidrios bioactivos depende en parte de sus productos de disolución iónica (Si, Ca, P). Y sus capacidades antimicrobianas, de los iones añadidos como el zinc. Simultáneamente a través de un equipo conjunto de investigación, se ha demostrado el gran potencial osteoinductor de la osteostatina cuando se añade sobre una biocerámica con ventajas sobre las BMP (Lozano et al, 2012). Este péptido presenta una actividad anabólica, anti catabólica y anti adipogénica además de osteoinductora, que consigue aumentando la acción de los osteoblastos y el VEGF y disminuyendo la actividad de los osteoclastos. Estos efectos positivos son específicos de las células óseas y los queratinocitos al contrario que los generados por las BMP, cuyo efecto es pleiotrópico pudiendo actuar en muchos tejidos e incluso activar el sistema inmune. En estudios previos de nuestro grupo, demostramos *in vitro* por primera vez un efecto sinérgico del zinc y la osteostatina para mejorar el crecimiento de células MSC y su diferenciación osteogénica (Heras et al, 2019). Uno de nuestros objetivos era valorar si ese efecto se confirmaba también en un modelo animal. Para ello, este proyecto ha sido el primero centrado en investigar en un defecto

crítico in vivo esta combinación de vidrios mesoporosos bioactivos, mejorados por añadir un ion osteogénico y bactericida como el zinc y un pentapéptido osteogénico y antirresortivo, la osteostatina, además de las células mesenquimales. La gelatina añadida para proporcionar resistencia dada la necesidad por el gran defecto, se eligió como polímero endurecedor ya que es una forma hidrolizada de colágeno, biocompatible in vitro (M. Cicuéndez et al, 2012) y con alta bioabsorción in vivo (Gil-Albarova et al, 2012; Perut et al, 2011).

Nuestros resultados sugieren que los VM cargados con células y osteostatina, grupo B+C+O, mejoran significativamente la curación debido a la inducción de una mayor formación ósea (sobre todo a las 12 semanas), obteniendo mejores resultados en todos los parámetros óseos medidos, tanto en el volumen como en los valores trabeculares y corticales. Estos resultados están en concordancia con estudios previos donde la carga de osteostatina en diferentes biocerámicas y otros biomateriales mejora la reparación de defectos críticos y parcelares de huesos largos tanto en ratas como en conejos adultos sanos y osteoporóticos (Trejo et al, 2010; Lozano et al, 2012; Van der Stok et al, 2015). Al añadir células se produce un aumento de la angiogénesis y de la maduración del tejido creado. Y la liberación de iones zinc, estimula el proceso de formación de hueso osteoblástico y reduce el proceso de resorción osteoclástica.

A nivel macroscópico 16 de los 23 casos presentan un buen resultado en la reparación del defecto tanto por su aspecto, como por su resistencia y homogeneidad. 10 de ellos presentan un relleno completo con buena consistencia del tejido regenerado. Si incluimos aquellos en las que el defecto se repara por completo con más procesos de fibrosis asociados, incluimos 6 muestras más. En total, encontramos que los grupos B+C+O y B+C, inducen una mejor reparación del defecto a nivel macroscópico, algo que apreciamos en 6 y 7 de sus muestras respectivamente, seguidos del grupo B+O con solo 3 de sus casos en el grupo de buenos resultados.

A nivel histológico, la formación ósea aumenta en los grupos de B+C+O y B+O, en este último de forma más homogénea. Estos datos son consistentes con nuestra teoría inicial sobre la capacidad de las señales osteoinductores puesto que con ellas obtendremos una mejor respuesta en el proceso de consolidación. En la mayoría de las muestras se cumple con las fases esperadas a nivel histológico de la consolidación indirecta o secundaria, presente en los casos de defectos

con movilidad interfragmentaria o amplio espacio entre los fragmentos. Este tipo de consolidación tiene un proceso de reparación en el que, tras una fase de inflamación, se forma un callo blando o fibroso por activación de los osteoblastos que da lugar a una osificación encondral con formación de hueso inmaduro fibrilar y posteriormente hueso maduro tras la fase final de remodelación. En un trabajo con imágenes histológicas similares a las encontradas en el nuestro, describen procesos de osificación encondral partiendo de un modelo cartilaginoso (Rai et al, 2015). Encontraban hueso inmaduro sin hueso laminar ni formación de canales o sistemas de Havers, sino con lagunas vasculares de gran tamaño. Ese hueso neoformado e inmaduro se terminaría remodelando, pero no llegaría a cerrar el defecto. Parece que en los primeros estadios a las 6 semanas de nuestro estudio están más activados o inducidos los procesos de formación ósea, pero a las 12 semanas no hay material cerámico y el proceso de formación se detiene. La formación ósea que se ha detectado en algunas muestras no es suficiente como para conseguir la reparación del defecto óseo por su gran tamaño. Lo que encontramos en su lugar, es una formación conjuntiva de aspecto fibrocartilaginoso en la vecindad del tejido óseo normal. Se encuentra en un terreno intermedio del hueso, que presenta tanto una parte compacta como una parte trabecular. El hueso limitante a estas formaciones fibrosas presenta cierto grado de madurez al presentar médula ósea hematopoyética (MOH), por lo que se podría considerar que corresponde al hueso esponjoso que se encuentra entre las dos capas de hueso compacto en condiciones normales. Puede ser que, al tratarse de un defecto crítico, los tiempos de reparación sean insuficientes y de ahí su reparación incompleta. Otra opción a nivel histológico podría ser que la reacción ósea desencadenada se deba a una alteración de la capa del periostio. Esto ha llevado a la formación ósea a través de la diferenciación de células mesenquimales procedentes del tejido del periostio a células osteogénicas partiendo de condrocitos. La formación ósea se encuentra rodeada por tejido conectivo denso, con fibras muy organizadas y compactadas. El hueso regenerado por eso es inmaduro con cavidades osteocitarias aún no calcificadas y con la presencia de MOH en ellas. Estas dos opciones podrían tener que ver con la pérdida de aporte vascular y, por tanto, con la disminución de la tensión local de oxígeno que afectaría a la actividad celular y a su señalización con una activación de osteoblastos o condroblastos, alta en el primer caso, baja en el segundo.

Hasta hace unos años, esta histología era la referencia principal para la evaluación de la regeneración ósea. Pero hoy en día, gracias al micro-CT obtenemos información precisa acerca de la estructura del hueso, observando modificaciones en distintos parámetros como el grosor trabecular, separación trabecular o la densidad mineral. Esta información no corresponde exclusivamente a una zona de la pieza analizada como ocurre en la histología, sino a toda la muestra. Estos hechos hacen que ambas pruebas sigan siendo necesarias para obtener unos datos completos de las muestras analizadas.

Crear nuestro software de cuantificación ósea fue imprescindible ante la ausencia en el mercado de un formato libre no sujeto a los equipos de rayos X comercializados por determinadas compañías que no permiten adaptaciones a formatos de imagen diferentes. Los resultados obtenidos con esta herramienta, BoneAnalytics, nos mostraban un claro aumento del volumen total de hueso en todos los grupos de estudio y en ambos tiempos de seguimiento. Este valor, como esperábamos encontrar, era mayor a las 12 semanas. Al realizar el análisis estadístico comparativo entre los grupos, encontramos los mejores resultados en el grupo B+C+O con 6 resultados significativos ($p < 0.05$). Este hecho confirma nuestra hipótesis inicial en la que planteábamos que al añadir células y osteostatina en un equivalente tisular, éste generaría una mejor respuesta osteoinductora y osteogeneradora con una mayor formación ósea como resultado final.

Tanto los hallazgos histológicos como las imágenes de micro-CT apuntan a una degradación de los implantes parcial a las 6 semanas y completa en la mayoría de los casos a las 12 semanas. La evidencia de degradación y absorción de los materiales implantados se observó en los estudios de Bauer, mostrando un crecimiento progresivo de hueso y tejido fibroso sobre un sustituto de injerto óseo sintético (Bauer y Muschler, 2000). Este efecto positivo sobre el crecimiento óseo y la remodelación se observó previamente con andamios de biovidrio similares que contienen polipéptidos in vivo (Liu et al, 2014), y con otros materiales en defectos óseos críticos y parcelares (Gil-Albarova et al, 2004 y 2005), lo que podría sugerir un proceso de reclutamiento de células mesenquimales de tejidos circundantes y posterior transformación en células formadoras de hueso. En los casos en los que la reparación se ve insuficiente podría ocurrir que al reabsorberse

el material por completo a las 12 semanas se paren dichos procesos de reclutamiento y de formación ósea.

Nuestros resultados, en resumen, sugieren que los VM que contienen zinc con células mesenquimales y osteostatina mejoran significativamente la reparación en defectos críticos debido a la inducción de la regeneración ósea a la vez que se produce la degradación de los implantes. Además de caracterizar estructuralmente tanto el vidrio de partida como los soportes fabricados de forma que sean adecuados para el defecto creado y resistentes biomecánicamente, hemos demostrado su biocompatibilidad tras ensayar in vivo con un modelo validado de defecto crítico en conejo. Sin embargo, serán necesarios más estudios que incorporen un número de controles mayor para permitir una comparación con una significación suficiente, cumpliendo con las normas éticas en animales superiores como ovejas o cerdos y con tiempos experimentales más prolongados, necesarios antes del uso clínico de estos materiales.

7. CONCLUSIONES

1. El grupo con mejores resultados es el que contiene los tres componentes, vidrio mesoporoso bioactivo enriquecido con zinc, células mesenquimales y osteostatina (B+C+O), mejorando significativamente la reparación en defectos críticos debido a la inducción de una mayor formación ósea.
2. El modelo experimental en cúbito de conejo es un modelo adecuado por su coste, estructura ósea y disponibilidad.
3. El material producido y caracterizado estructuralmente es biocompatible, reproducible, aplicable y apto para su uso en defectos óseos críticos sin observar procesos adversos que puedan comprometer la formación de hueso.
4. En el análisis histológico hemos observado un aumento de la formación ósea en los grupos de B+C+O y B+O, más homogéneo en este último.
5. En el análisis de imagen, los parámetros óseos presentan una clara tendencia a la mejoría con respecto al tiempo en todos los grupos, siendo el grupo B+C+O el que alcanza más valores significativos a las 12 semanas en todos ellos, tanto en el volumen como en los valores trabeculares y corticales.
6. Validar una metodología para la cuantificación ósea integrada en la herramienta software BoneAnalytics ha sido un objetivo añadido que sin duda se utilizará en estudios futuros que precisen una adaptación para la medición de parámetros en defectos óseos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- **Andrzejowski, P. y Giannoudis P. (2019).** “The ‘Diamond concept’ for long bone non-union management”. *Journal of Orthopaedics and Traumatology* 20, n.º 1: 21.
- **Arcos, D., Izquierdo-Barba I. y Vallet-Regí, M. (2009).** “Promising trends of bioceramics in the biomaterials field”. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 20, n.º 2: 447-55.
- **Arcos, D. y Vallet-Regí, M. (2010).** “Sol–Gel Silica-Based biomaterials and bone tissue regeneration». *Acta Biomaterialia* 6, n.º 8: 2874-88.
- **Ardura, J.A., Portal-Núñez S., Lozano D., Gutiérrez-Rojas I., Sánchez-Salcedo S., López-Herradón A., Mulero F., Villanueva-Peñacarrillo M.L., Vallet-Regí M. y Esbrit P. (2016).** “Local delivery of parathyroid hormone-related protein-derived peptides coated onto a hydroxyapatite-based implant enhances bone regeneration in old and diabetic rats: pthrp-derived peptides improve bone healing in old diabetic rats”. *Journal of biomedical materials research part A* 104, n.º 8: 2060-70.
- **Aydin Sevinç, B. y Hanley L. (2010).** “Antibacterial activity of dental composites containing zinc oxide nanoparticles”. *Journal of biomedical materials research part B: Applied Biomaterials* 9999B: NA-NA.
- **Bauer, T.W. y Muschler G.F. (2000).** “Bone graft materials. an overview of the basic science”. *Clinical orthopaedics and related research*, n.º 371: 10-27.
- **Bhamb, N., Kanim L., Drapeau S., Mohan S., Vasquez E., Shimko D., McKay W. y Bae H.W. (2019).** “Comparative efficacy of commonly available human bone graft substitutes as tested for posterolateral fusion in an athymic rat model”. *International journal of spine surgery* 13, n.º 5: 437-58.
- **Bouxsein, M.L., Boyd S.K, Christiansen B.A., Guldberg R.E., Jepsen K.J. y Müller, R. (2010).** “Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography”. *Journal of bone and mineral research* 25, n.º 7: 1468-86.

- **Bucholz, R.W., Heckman J.D., Rockwood C.A. y Green D.P. (2003).** *Rockwood & Green's fracturas en el adulto*. Madrid: Marbán, 2003.
- **Chou, J., Hao J., Hatoyama H., Ben-Nissan B., Milthorpe B. y Otsuka M. (2015).** "Effect of biomimetic zinc-containing tricalcium phosphate (Zn-TCP) on the growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: effect of zn-tcp on growth and osteogenic differentiation of MSCs". *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 9, n.º 7: 852-58.
- **Cicuéndez, M., Izquierdo-Barba I., Sánchez-Salcedo S., Vila M. y Vallet-Regí M. (2012).** "Biological performance of hydroxyapatite–biopolymer foams: in vitro cell response". *Acta Biomaterialia* 8, n.º 2: 802-10.
- **Cook, S.D. (1999).** "Preclinical and clinical evaluation of osteogenic protein-1 (BMP-7) in bony sites". *Orthopedics* 22, n.º 7: 669-71.
- **Cornish, J., Callon K.E., Nicholson G.C. y Reid I.R. (1997).** "Parathyroid hormone-related protein-(107–139) inhibits bone resorption in vivo". *Endocrinology* 138, n.º 3: 1299-1304.
- **Cox, G., Jones E., McGonagle D. y Giannoudis P. (2011).** "Reamer-Irrigator-aspirator indications and clinical results: a systematic review". *International Orthopaedics* 35, n.º 7: 951-56.
- **Cui, L., Liu B., Liu G., Zhang W., Cen L., Sun J., Yin S., Liu W. y Cao Y. (2007).** "Repair of Cranial Bone Defects with Adipose Derived Stem Cells and Coral Scaffold in a Canine Model". *Biomaterials* 28, n.º 36: 5477-86.
- **Delgado Martínez, A.D. (2019).** *Cirugía ortopédica y traumatología*, 2019.
- **Dimitriou, R., Jones E., McGonagle D. y Giannoudis PV. (2011).** "bone regeneration: current concepts and future directions". *BMC Medicine* 9, n.º 1: 66.
- **Dimitriou, R., Tsiridis E. y Giannoudis PV. (2005).** "Current concepts of molecular aspects of bone healing". *Injury* 36, n.º 12: 1392-1404.

- **Doadrio, A., Salinas A., Sánchez-Montero J. y Vallet-Regí M. (2015).** “Drug release from ordered mesoporous silicas”. *Current Pharmaceutical Design* 21, n.º 42: 6213-6819.
- **Egol, KA., Nauth A., Lee M., Pape HC., Tracy Watson J. y Borrelli J. (2015).** “Bone grafting: sourcing, timing, strategies, and alternatives”. *Journal of orthopaedic trauma* 29 Suppl 12: S10-14.
- **Einhorn, T. A., Lane J.M., Burstein A.H., Kopman, CR. y Vigorita VJ (1984).** “The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. a radiographic and biomechanical study”. *The journal of bone and joint surgery. American Volume* 66, n.º 2: 274-79.
- **El-Jawhari, JJ., Sanjurjo-Rodríguez C., Jones E. y Giannoudis PV. (2016).** “Collagen-containing scaffolds enhance attachment and proliferation of non-cultured bone marrow multipotential stromal cells: MSC growth on collagen-containing scaffolds”. *Journal of orthopaedic research* 34, n.º 4: 597-606.
- **Esbrit, P. y Alcaraz M.J. (2013).** “Current Perspectives on parathyroid hormone (pth) and pth-related protein (pthrp) as bone anabolic therapies”. *Biochemical Pharmacology* 85, n.º 10: 1417-23.
- **Fayaz, Hangama C., Giannoudis PV., Vrahas M., Malcolm Smith R., Moran C., Pape HC., Krettek C., y Jupiter JB. (2011).** “The role of stem cells in fracture healing and nonunion». *International Orthopaedics* 35, n.º 11:1587-97.
- **Feldkamp, L., Goldstein S., Parfitt M., Jasion G. y Kleerekoper M. (2009).** “The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography”. *Journal of Bone and Mineral Research* 4, n.º 1: 3-11.
- **Fenton, A.J., Kemp B., Hammonds R., Mitchelhill K., Moseley J., Martin T, y Nicholson G. (1991).** “Potent inhibitor of osteoclastic bone resorption within a highly conserved pentapeptide region of parathyroid hormone-related protein; PTHrP[107–Lll]”. *Endocrinology* 129, n.º 6: 3424-26.

- **Ford, L.T. y Key J.A. (1956).** “A Study of experimental trauma to the distal femoral epiphysis in rabbits”. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 38-A, n.º 1: 84-92.
- **Ford, Lee T. (1954).** “Experimental study of effect of pressure on healing of bone”. *Archives of Surgery* 69, n.º 5: 627.
- **Frost, H.M. (2004).** “A 2003 update of bone physiology and wolff’s law for clinicians”. *The Angle Orthodontist* 74, n.º 1: 3-15.
- **Frost, H.M. (2003).** “Bone’s Mechanostat: A 2003 Update”. *The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 275, n.º 2: 1081-1101.
- **Gerhardt, L.C. y Boccaccini AR (2010).** “bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering”. *Materials* 3, n.º 7: 3867-3910.
- **Giannoudis, PV., Gudipati S., Harwood P. y Kanakaris N.K. (2015).** “Long bone non-unions treated with the diamond concept: a case series of 64 patients». *Injury* 46: S48-54.
- **Giannoudis, PV. y Tzioupis C. (2005).** “Clinical Applications of BMP-7”. *Injury* 36, n.º 3: S47-50.
- **Gil-Albarova, J., Vila M., Badiola-Vargas J., Sánchez-Salcedo S., Herrera A. y Vallet-Regí M. (2012).** “In Vivo osteointegration of three-dimensional crosslinked gelatin-coated hydroxyapatite foams”. *Acta Biomaterialia* 8, n.º 10: 3777-83.
- **Gil-Albarova, J., Salinas A.J., Bueno-Lozano A.L., Román J., Aldini-Nicolo N., García-Barea A., Giavaresi G., Fini M., Giardino R. y M. Vallet-Regí (2005).** “The in vivo behaviour of a sol–gel glass and a glass-ceramic during critical diaphyseal bone defects healing”. *Biomaterials* 26, n.º 21: 4374-82.
- **Gil-Albarova, J., Garrido-Lahiguera R., Salinas A.J., Román J., Bueno-Lozano A.L., Gil-Albarova R., y Vallet-Regí M. (2004).** “The in vivo performance of a sol–gel glass and a glass-ceramic in the treatment of limited bone defects”. *Biomaterials* 25, n.º 19: 4639-45.

- **Gómez Barrena, E. y Cordero Ampuero J. (2020).** Traumatología y ortopedia: generalidades. Barcelona: Elsevier, 2020.
- **Gómez-Cerezo, N., Izquierdo-Barba I., Arcos D. y M. Vallet-Regí. (2015).** “Tailoring the biological response of mesoporous bioactive materials”. *Journal of materials chemistry. B* 3, n.º 18: 3810-19.
- **Gottlow, J. (1993).** “Guided tissue regeneration using bioresorbable and non-resorbable devices: initial healing and long-term results”. *Journal of periodontology* 64, n.º 11s: 1157-65.
- **Gottlow, J, Nyman S., Karring T. y Lindhe J. (1984).** “New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration”. *Journal of clinical periodontology* 11, n.º 8: 494-503.
- **Griffith, L. G. (2002).** “Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities”. *Science* 295, n.º 5557: 1009-14.
- **Guerado, E. y Caso E. (2017).** “Challenges of bone tissue engineering in orthopaedic patients”. *World journal of orthopedics* 8, n.º 2: 87.
- **Gugala, Z. y Gogolewski S. (1999).** “Regeneration of segmental diaphyseal defects in sheep tibiae using resorbable polymeric membranes: a preliminary study”: *Journal of Orthopaedic Trauma* 13, n.º 3: 187-95.
- **Haines, N.M., Lack W.D., Seymour R.B. y Bosse M.J. (2016).** “Defining the lower limit of a “critical bone defect” in open diaphyseal tibial fractures” *Journal of Orthopaedic Trauma* 30, n.º 5: e158-63.
- **Hall, T.J. y Chambers T.J. (1990).** “Gallium inhibits bone resorption by a direct effect on osteoclasts”. *Bone and Mineral* 8, n.º 3: 211-16.
- **Hattori, Y., Haruna Y. y Otsuka M. (2013).** “Dissolution process analysis using model-free noyes–whitney integral equation». *Colloids and surfaces b: biointerfaces* 102: 227-31.
- **Haubruck, P., Tanner M., Vlachopoulos W., Hagelskamp S., Miska M., Ober J., Fischer C. y Schmidmaier G. (2018).** “Comparison of the clinical effectiveness of bone

- morphogenic protein (bmp) -2 and -7 in the adjunct treatment of lower limb nonunions”. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research* 104, n.º 8: 1241-48.
- **Hench, L.L. (1973).** “Ceramics, Glasses, and Composites in Medicine”. *Medical Instrumentation* 7, n.º 2: 136-44.
 - **Heras, C., Sanchez-Salcedo S., Lozano D., Peña J., Esbrit P., Vallet-Regi M. y Salinas A.J. (2019).** “Osteostatin potentiates the bioactivity of mesoporous glass scaffolds containing Zn²⁺ ions in human mesenchymal stem cells”. *Acta Biomaterialia* 89: 359-71.
 - **Hildebrand, T., Laib A., Müller R., Dequeker J. y Rüdsegger P. (1999).** “Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus”. *Journal of Bone and Mineral Research* 14, n.º 7: 1167-74.
 - **Hollinger, J.O. y Kleinschmidt J.C. (1990).** “The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials”: *Journal of Craniofacial Surgery* 1, n.º 1: 60-68.
 - **Hoppe, A., Güldal N.S. y Boccaccini A.R. (2011).** “A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics”. *Biomaterials* 32, n.º 11: 2757-74.
 - **Ho-Shui-Ling, A., Bolander J., Rustom L.E., Wagoner Johnson A., Luyten F.P, y Picart C. (2018).** “Bone regeneration strategies: engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives”. *Biomaterials* 180: 143-62.
 - **Imam, MA., Holton J., Ernstbrunner L., Pepke W., Grubhofer F., Narvani A. y Snow M. (2017).** “A systematic review of the clinical applications and complications of bone marrow aspirate concentrate in management of bone defects and nonunions”. *International Orthopaedics* 41, n.º 11: 2213-20.
 - **Inacio, M., Paxton E., Graves S., Namba R. y Nemes S. (2017).** “projected increase in total knee arthroplasty in the united states – an alternative projection model”. *Osteoarthritis and Cartilage* 25, n.º 11: 1797-1803.

- **Ito, M. (2011).** “Animal models for bone and joint disease. Assessment of bone mass, structure and strength in rat and mouse models - focus on micro-computed tomography study”. *Clinical Calcium* 21, n.º 2: 242-52.
- **Jilka, R. L. (2007).** “Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH”. *Bone* 40, n.º 6: 1434-46.
- **Jones, J. R. (2013).** “Review of bioactive glass: from hench to hybrids». *Acta Biomaterialia* 9, n.º 1: 4457-86.
- **Kadhim, M., Holmes L., Gesheff M-G. y Conway J.D. (2017).** “treatment options for nonunion with segmental bone defects: systematic review and quantitative evidence synthesis». *Journal of Orthopaedic Trauma* 31, n.º 2: 111-19.
- **Karring, T., Nyman S., Gottlow J. y Laurell L. (1993).** “Development of the biological concept of guided tissue regeneration--animal and human studies”. *Periodontology* 2000 1: 26-35.
- **Kaya, S., Cresswell M. y Boccaccini A.R. (2018).** “Mesoporous silica-based bioactive glasses for antibiotic-free antibacterial applications”. *Materials Science and Engineering: C* 83: 99-107.
- **Kim, H., Bae C., Kook Y., Koh W., Lee K. y Hee Park M. (2019).** “Mesenchymal stem cell 3d encapsulation technologies for biomimetic microenvironment in tissue regeneration”. *Stem Cell Research & Therapy* 10, n.º 1: 51.
- **Kim, Y., Kang B., Kim W., Yun H. y Kweon O. (2018).** “Evaluation of mesenchymal stem cell sheets overexpressing bmp-7 in canine critical-sized bone defects». *International Journal of Molecular Sciences* 19, n.º 7: 2073.
- **Lee, J.A., Parrett B.M., Conejero J.A., Laser J., Chen J., Kogon A.J., Nanda D., Grant R.T., y Breitbart A.S. (2003).** “Biological alchemy: engineering bone and fat from fat-derived stem cells». *Annals of Plastic Surgery* 50, n.º 6: 610-17.
- **Liu, W., Robu I.S., Patel R., Leu M.C., Velez M. y Gabriel Chu T. (2014).** “The effects of 3D bioactive glass scaffolds and BMP-2 on bone formation in rat femoral critical size defects and adjacent bones”. *Biomedical Materials* 9, n.º 4: 045013.

- **Lozano, D., Sánchez-Salcedo S., Portal-Núñez S., Vila M., López-Herradón A., Ardura J.A., Mulero F., Gómez-Barrena E., Vallet-Regí M. y Esbrit P. (2014).** “Parathyroid Hormone-Related Protein (107-111) improves the bone regeneration potential of gelatin–glutaraldehyde biopolymer-coated hydroxyapatite”. *Acta Biomaterialia* 10, n.º 7: 3307-16.
- **Lozano, D., Trejo C.G., Gómez-Barrena E., Manzano M., Doadrio J.C., Salinas A.J., Vallet-Regí M., García-Honduvilla N., Esbrit P. y Buján J. (2012).** “Osteostatin-loaded onto mesoporous ceramics improves the early phase of bone regeneration in a rabbit osteopenia model”. *Acta Biomaterialia* 8, n.º 6: 2317-23.
- **Lu, C., Miclau T., Hu D, Hansen E., Tsui K., Puttlitz C. y Marcucio R.S. (2005).** “Cellular Basis for Age-Related Changes in Fracture Repair”. *Journal of Orthopaedic Research* 23, n.º 6: 1300-1307.
- **Madison, R.D. y Nowotarski P.J. (2019).** “The Reamer-Irrigator-Aspirator in Nonunion Surgery”. *The Orthopedic Clinics of North America* 50, n.º 3: 297-304.
- **Manzano, M. y Vallet-Regí M. (2018).** “Mesoporous silica nanoparticles in nanomedicine applications». *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 29, n.º 5: 65.
- **Masquelet, A.C. (2017).** “Induced membrane technique: pearls and pitfalls”. *Journal of Orthopaedic Trauma* 31 Suppl 5: S36-38.
- **Masquelet, A.C. y Begue T. (2010).** “The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects”. *Orthopedic Clinics of North America* 41, n.º 1: 27-37.
- **Meseguer-Olmo, L., Bernabeu-Esclapez A., Ros-Martinez, E., Sánchez-Salcedo, S., Padilla, S., Martín, A.I., Vallet-Regí, M., Clavel-Sainz, M., Lopez-Prats, F., y Meseguer-Ortiz, C.L. (2008).** “In vitro behaviour of adult mesenchymal stem cells seeded on a bioactive glass ceramic in the SiO₂–CaO–P₂O₅ System”. *Acta Biomaterialia* 4, n.º 4: 1104-13.
- **Miller, M.D. (2016).** Ed. *Review of Orthopaedics. 7th Ed. Elsevier. Philadelphia, 2016.*

- **Mills, L. A., y Simpson A.H. (2012):** “*In vivo* models of bone repair». *the journal of bone and joint surgery. british volume* 94-B, n.º 7: 865-74.
- **Mouriño, V., Cattalini, J.P. y Boccaccini A.R. (2012):** “Metallic ions as therapeutic agents in tissue engineering scaffolds: an overview of their biological applications and strategies for new developments”. *Journal of the royal society interface* 9, nº 68: 401-19.
- **Nauth, A., Lane, J., Watson, J. y Giannoudis P. (2015):** “Bone graft substitution and augmentation”. *Journal of Orthopaedic Trauma* 29: S34-38.
- **Nauth, A., Schemitsch, E., Norris, B., Nollin, Z. y Tracy Watson J. (2018):** “Critical-size bone defects: is there a consensus for diagnosis and treatment?” *Journal of Orthopaedic Trauma* 32, n.º Supplement 3: S7-11.
- **Nombela-Arrieta, C., Ritz, J. y Silberstein, L.E. (2011):** “The elusive nature and function of mesenchymal stem cells”. *Nature reviews molecular cell biology* 12, n.º 2: 126-31.
- **Oryan, A., Meimandi Parizi, A., Shafiei-Sarvestani, Z. y Bigham A.S. (2012):** “Effects of combined hydroxyapatite and human platelet rich plasma on bone healing in rabbit model: radiological, macroscopical, histopathological and biomechanical evaluation”. *Cell and Tissue Banking* 13, n.º 4: 639-51.
- **Pabinger, C., Lothaller, H., Portner, N. y Geissler A. (2018):** “projections of hip arthroplasty in oecd countries up to 2050”. *HIP International* 28, n.º 5: 498-506.
- **Pape, H.C., Evans, A. y Kobbe P. (2010):** “Autologous bone graft: properties and techniques”. *Journal of Orthopaedic Trauma* 24 Suppl 1: S36-40.
- **Park, S., O’Connor, K., Sung, R., H. McKellop, H. y Sarmiento, A. (1999):** “Comparison of healing process in open osteotomy model and closed fracture model”: *Journal of Orthopaedic Trauma* 13, n.º 2: 114-20.
- **Pearce A., Richards R., Milz S., Schneider E. y Pearce Sg. (2007):** “Animal models for implant biomaterial research in bone: A review”. *European Cells and Materials* 13: 1-10.

- **Pérez, R., Sanchez-Salcedo, S., Lozano, D., Heras, C., Esbrit, P., Vallet-Regí, M. y Salinas A. (2018):** “Osteogenic effect of zno-mesoporous glasses loaded with osteostatin». *Nanomaterials* 8, n.º 8: 592.
- **Perut, F., Montufar, E.B., Ciapetti, G., Santin, M., Salvage, J., Traykova, T., Planell, J.A., Ginebra, M.P. y Baldini N. (2011):** “Novel soybean/gelatine-based bioactive and injectable hydroxyapatite foam: material properties and cell response». *Acta Biomaterialia* 7, n.º 4: 1780-87.
- **Quintana Plaza, J., L. Benito Garzón, L., Bravo Gimenez, B., Fernández-Montes Moraleda B., Collía, F. y Rodríguez-Lorenzo, L.M. (2016):** “Application of calcium phosphates and fibronectin as complementary treatment for osteoporotic bone fractures”. *Injury* 47: S15-21.
- **Porter, J.R., Ruckh, T. y Popat, K.P. (2009):** “Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies”. *Biotechnology Progress*: NA-NA.
- **Rai, B., Chatterjea, A., Lim, Z.X.H., Tan, T.C., Sawyer, A.A., Hosaka, Y.Z., Murali, S. (2015):** “Repair of segmental ulna defects using a β -tcp implant in combination with a heparan sulfate glycosaminoglycan variant”. *Acta Biomaterialia* 28: 193-204.
- **Reichert, J.C., Saifzadeh, S., Wullschleger, M.E., Epari, D.R., Schütz, M.A., Duda, G.N., Schell, H., Van Griensven, M., Redl, H. y Hutmacher D.W. (2009):** “The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research”. *Biomaterials* 30, n.º 12: 2149-63.
- **Roddy, E., DeBaun, M.R., Daoud-Gray, A., Yang, Y.P. y Gardner, M.J. (2018):** “Treatment of critical-sized bone defects: clinical and tissue engineering perspectives”. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology* 28, n.º 3: 351-62.
- **Saldaña, L., Sánchez-Salcedo, S., Izquierdo-Barba, I., Bensiamar, F., Munuera, L., Vallet-Regí, M. y Vilaboa, N. (2009):** “Calcium phosphate-based particles influence osteogenic maturation of human mesenchymal stem cells”. *Acta Biomaterialia* 5, n.º 4: 1294-1305.

- **Salinas, A.J., Esbrit, P. y Vallet-Regí, M. (2013):** “A tissue engineering approach based on the use of bioceramics for bone repair”. *Biomater. Sci.* 1, n.º 1: 40-51.
- **Salinas, A. J., Shruti, S., Malavasi, G., Menabue L. y Vallet-Regí, M. (2011).** «Substitutions of cerium, gallium and zinc in ordered mesoporous bioactive glasses». *Acta Biomaterialia* 7, n.º 9: 3452-58.
- **Salinas, A.J., Merino, J.M., Babonneau, F., Gil, J. y Vallet-Regí, M. (2007).** “Microstructure and macroscopic properties of bioactive CAO-SiO₂-PDMS hybrids”. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied Biomaterials* 81, n.º 1: 274-82.
- **Salinas, A. J., Martín, A.I. y Vallet-Regí, M. (2002):** “Bioactivity of three CaO-P₂O₅-SiO₂ Sol-gel glasses”. *Journal of Biomedical Materials Research* 61, n.º 4: 524-32.
- **Sánchez-Salcedo, S., Shruti, S., Salinas, A.J., Malavasi, G., Menabue, L. y Vallet-Regí, M. (2014):** “In vitro antibacterial capacity and cytocompatibility of SiO₂-CaO-P₂O₅ Meso-Macroporous Glass Scaffolds Enriched with ZnO”. *J. Mater. Chem. B* 2, n.º 30: 4836-47.
- **Schemitsch, E.H. (2017):** “Size matters: defining critical in bone defect size!” *Journal of Orthopaedic Trauma* 31: S20-22.
- **Schubert, D., Dargusch, R., Raitano, J. y Chan, S. (2006):** “Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342, n.º 1: 86-91.
- **Shapiro F. (2008).** “Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts”. *European Cells and Materials* 15: 53-76.
- **Shors, E.C. (1999):** “Coralline bone graft substitutes”. *Orthopedic Clinics of North America* 30, n.º 4: 599-613.
- **Shruti, S., Salinas, A.J., Lusvardi, G., Malavasi, G., Menabue, L. y Vallet-Regi. M. (2013):** “Mesoporous bioactive scaffolds prepared with cerium, gallium and zinc containing glasses”. *Acta Biomaterialia* 9, n.º 1: 4836-44.

- **Smith, R.P., Machado C.A. y F.H. Netter. (2011).** The Netter collection of medical illustrations. 2nd ed. Philadelphia, PA: Elsevier, 2011.
- **Tarchala, M., Harvey, E.J. y Barralet, J. (2016):** “Biomaterial-stabilized soft tissue healing for healing of critical-sized bone defects: the masquelet technique”. *Advanced Healthcare Materials* 5, n.º 6: 630-40.
- **Trejo, C.G., Lozano, D., Manzano, M., Doadrio, J.C., Salinas, A.J., Vallet-Regí, M., García-Honduvilla, N., y Buján, J. (2010):** “The osteoinductive properties of mesoporous silicate coated with osteostatin in a rabbit femur cavity defect model”. *Biomaterials* 31, n.º 33: 8564-73.
- **Vaccaro, A.R., Whang, P., Patel, T., Phillips, F., Anderson, D., Albert, T., Hilibrand, A. et al (2008):** “The safety and efficacy of OP-1 (RhBMP-7) as a replacement for iliac crest autograft for posterolateral lumbar arthrodesis: minimum 4-Year Follow-up of a Pilot Study”. *The Spine Journal* 8, n.º 3: 457-65.
- **Valappil, S.P., Ready, D., Abou Neel, E.A., Pickup, D.M., O'Dell, L.A., Chrzanowski, W., Pratten, J. et al. (2009):** “Controlled delivery of antimicrobial gallium ions from phosphate-based glasses” *Acta Biomaterialia* 5, n.º 4: 1198-1210.
- **Vallet-Regí, M. (2019).** “Bioceramics: from bone substitutes to nanoparticles for drug delivery”. *Pure and Applied Chemistry* 91, n.º 4: 687-706.
- **Vallet-Regí, M. y Salinas, A.J. (2018):** “Role of the short distance order in glass reactivity”. *Materials (Basel, Switzerland)* 11, n.º 3.
- **Vallet-Regí, M., Colilla, M., Izquierdo-Barba, I. y Manzano, M. (2017):** “Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery: current insights”. *Molecules* 23, n.º 1: 47.
- **Vallet-Regí, M., Izquierdo-Barba, I. y Colilla, M. (2012):** “Structure and functionalization of mesoporous bioceramics for bone tissue regeneration and local drug delivery”. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 370, n.º 1963: 1400-1421.
- **Vallet-Regí, M., Salinas, A.J. y Arcos, D. (2006):** “From the Bioactive Glasses to the Star Gels”. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 17, n.º 11: 1011-17.

- **Van der Stok, J.; Lozano D., Chin Chai, J., Amin Yavari, S.; Bastidas Coral, A.; N. Verhaar, J.A.; Gómez-Barrena, E., et al. (2015):** “Osteostatin-Coated Porous Titanium Can Improve Early Bone Regeneration of Cortical Bone Defects in Rats”. *Tissue Engineering. Part A* 21, n.º 9-10: 1495-1506.
- **Welsch, U., Sobotta, J. y Deller, T. (2016).** *Sobotta, Histología*. Buenos Aires; Madrid: Panamericana, 2016.
- **Westerhuis, R.J., Van Bezooijen, R.L. y Kloen, P. (2005):** “Use of bone morphogenetic proteins in traumatology». *Injury* 36, n.º 12: 1405-12.
- **Wilson, S.M., Goldwasser, M.S., Clark, S.G., E., Bionaz, M., Hurley, W.L., Rodriguez-Zas, S., Feng, L., Dymon, Z. y Wheeler, M.B. (2012):** “Adipose-derived mesenchymal stem cells enhance healing of mandibular defects in the ramus of swine”. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 70, n.º 3: e193-203.
- **Wu, C., Luo, Y., Cuniberti, G., Xiao, Y. y Gelinsky M. (2011a):** “Three-Dimensional printing of hierarchical and tough mesoporous bioactive glass scaffolds with a controllable pore architecture, excellent mechanical strength and mineralization ability”. *Acta Biomaterialia* 7, n.º 6: 2644-50.
- **Wu, C., Miron, R., Sculean, A., Kaskel, S., Doert, T., Schulze, R. y Zhang Y. (2011b):** “Proliferation, differentiation and gene expression of osteoblasts in boron-containing associated with dexamethasone deliver from mesoporous bioactive glass scaffolds”. *Biomaterials* 32, n.º 29: 7068-78.
- **Zhang, L., Yang, G., Johnson, B.N. y Jia, X. (2019):** “Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair”. *Acta Biomaterialia* 84: 16-33.

9. DIFUSIÓN CIENTÍFICA DE LA TESIS

Los resultados producidos hasta el momento actual con relación a esta tesis son:

- Congreso de la Sociedad Europea de Biomateriales 2019 (Dresden, Alemania).

Bone regeneration capacity of bioactive glasses containing zinc, osteostatin and mesenchymal cells for the treatment of critical defects in rabbit ulna. B. Bravo-Giménez, C. Heras, L. Benito-Garzon, D. Lozano, G. Luengo-Alonso Lozano, S. Sanchez-Salcedo, A. J. Salinas, M. Vallet-Regi.

- Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica, 2019 (Santander, España).

BoneAnalytics: software para cuantificación ósea en imágenes de TAC. P.M. Berdón, N. Ballesteros, B. Bravo, D. Lozano, C. Heras, A. Salinas, M. Desco, M. Abella.

En ambos casos, nos encontramos en proceso de preparación de dos artículos científicos para la revista Acta Biomaterialia y Materials respectivamente.

10.ANEXO DE RESULTADOS

Análisis macroscópico

A continuación, se adjuntan imágenes del análisis macroscópico de casos de los tres grupos de estudio.

Caso C6: H61401

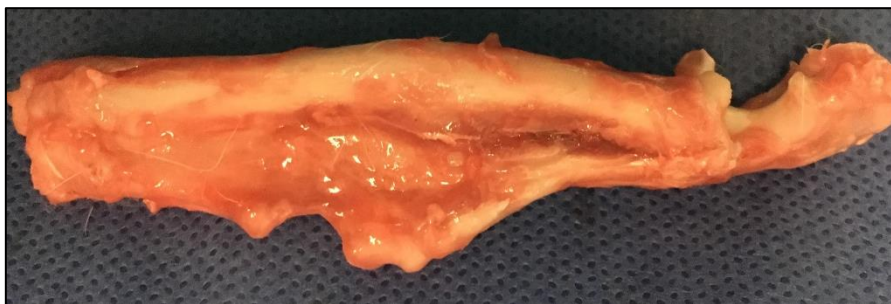


Fig M1. Relleno completo del defecto con zona hipertrófica de tejido fibroso

Caso C7: H81260

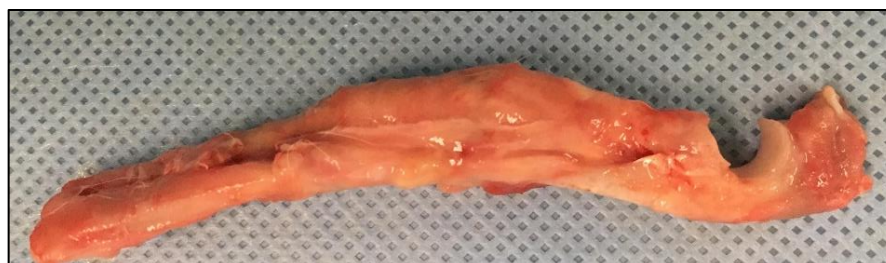


Fig M2. Relleno completo con buena consistencia y aspecto similar al hueso normal

Caso C15: 900046000192222

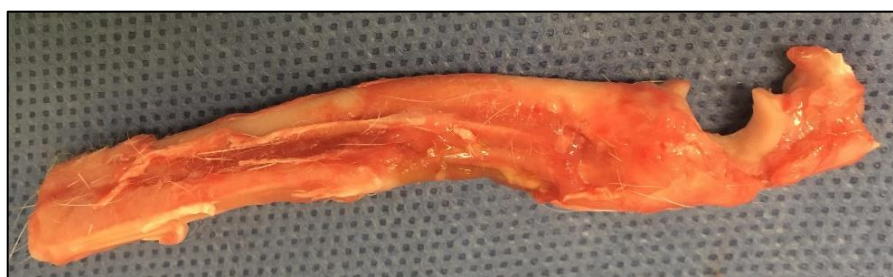


Fig M3. Relleno parcial del defecto con zona de tejido fibroso y movilidad interfragmentaria

Caso C16: 900046000192230



Fig M4. Relleno parcial fibroso

Caso C17: 900046000192221

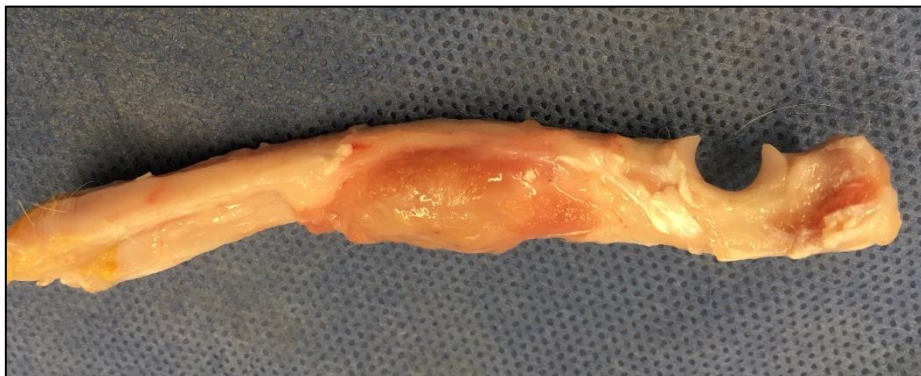


Fig M5. Relleno completo de consistencia media y buen aspecto

Caso C18: 900046000192224

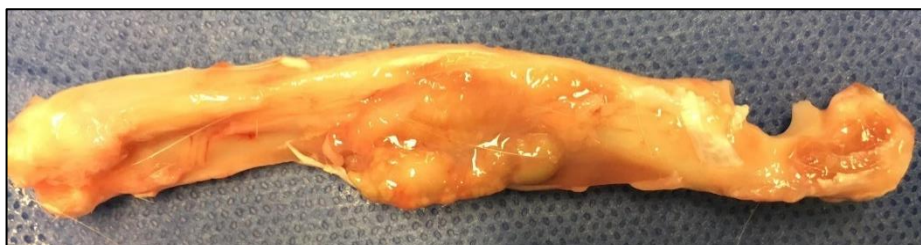


Fig M6. Relleno completo de aspecto fibroso y poco homogéneo

Caso C20: 900046000192226



Fig M7. Relleno completo de consistencia media

Caso C21: 900046000192227



Fig M8. Relleno completo con aspecto homogéneo

Caso C22: 900046000192229



Fig M9. Relleno parcial con reacción granulomatosa y fibrosis

Caso C23: H71624

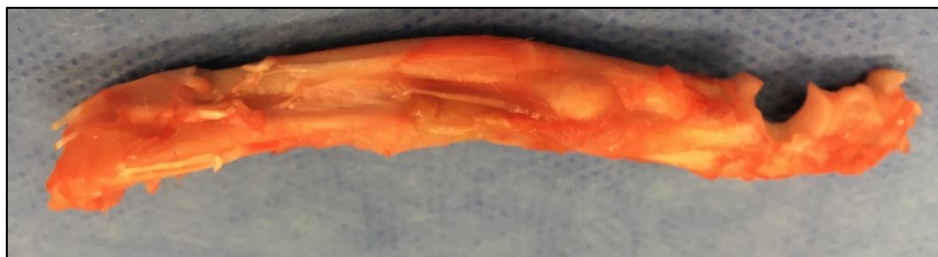


Fig M10. Relleno completo con zonas de fibrosis

Caso C24: H61074



Fig M11. Relleno completo fibroso

Caso C25: H31088



Fig M12. Relleno completo con buena consistencia y aspecto

Caso C31: H71544



Fig M13. Relleno parcial con mal aspecto macroscópico

Análisis histológico

A continuación, se exponen el resto de imágenes del estudio histológico, desarrollado en función del tiempo de seguimiento, 6 y 12 semanas, y material implantado.

Seguimiento de 6 semanas

- Grupo control: B (una única muestra)

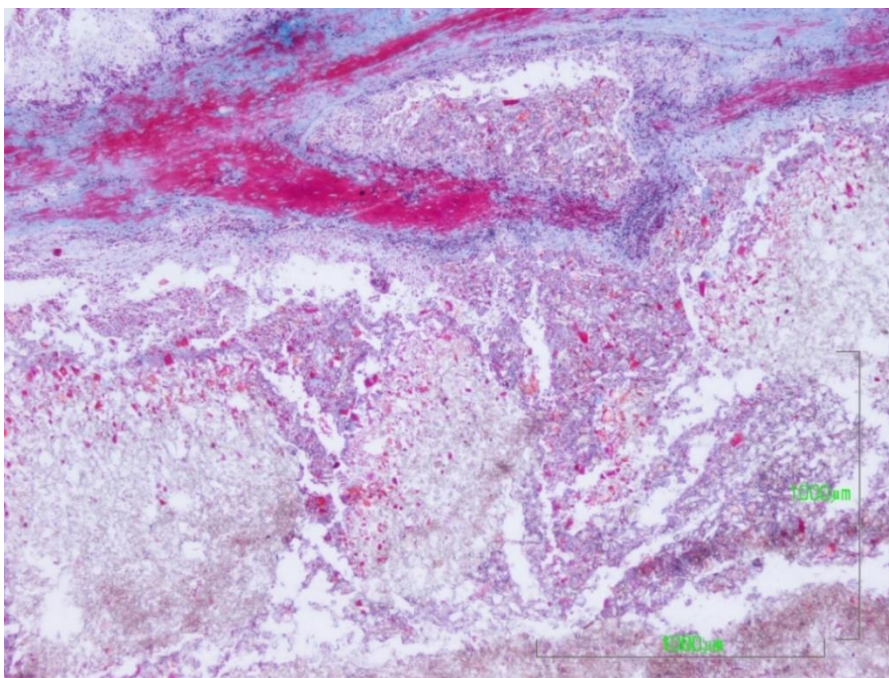


Fig H1. C11. En el defecto óseo sin regenerar, apreciamos formaciones a modo de tabiques que delimitan de manera algo más individualizada algunos de los restos de material.

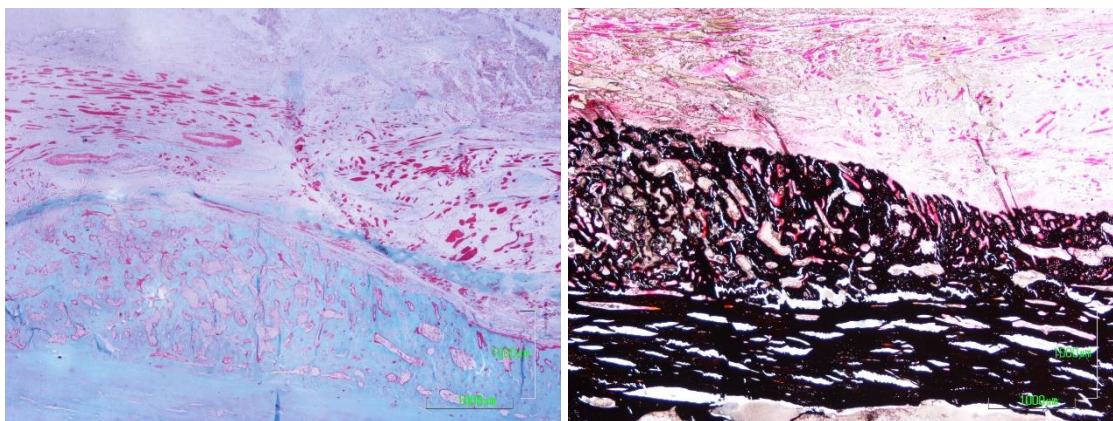


Fig H2. C11. Panorámica de la reacción de formación ósea encontrando hueso inmaduro y desorganizado. 2x

○ Grupo B+C

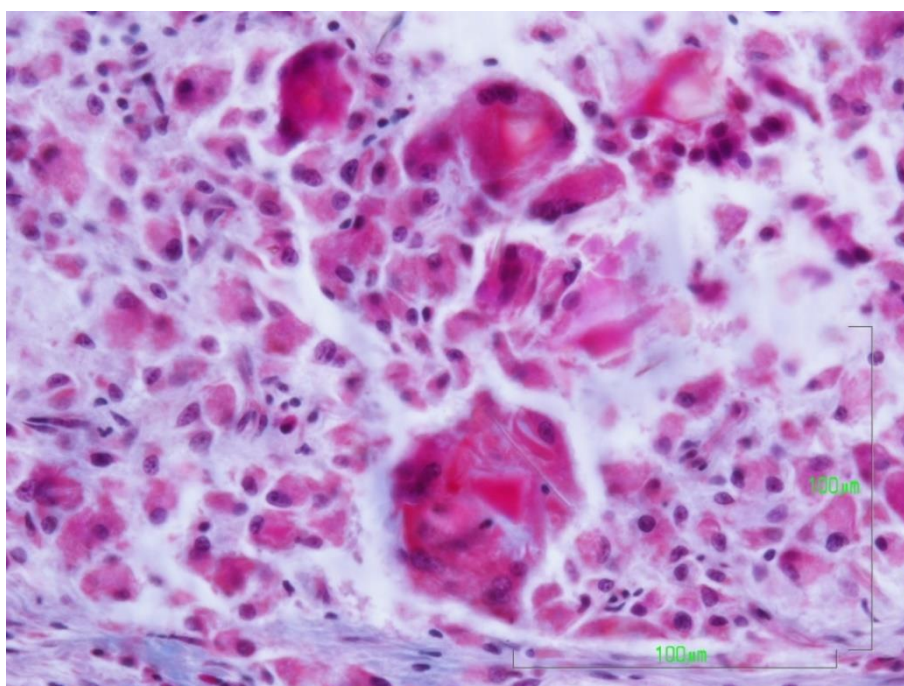


Fig H3. Detalle a gran aumento de células multinucleadas englobando restos de material. 40x

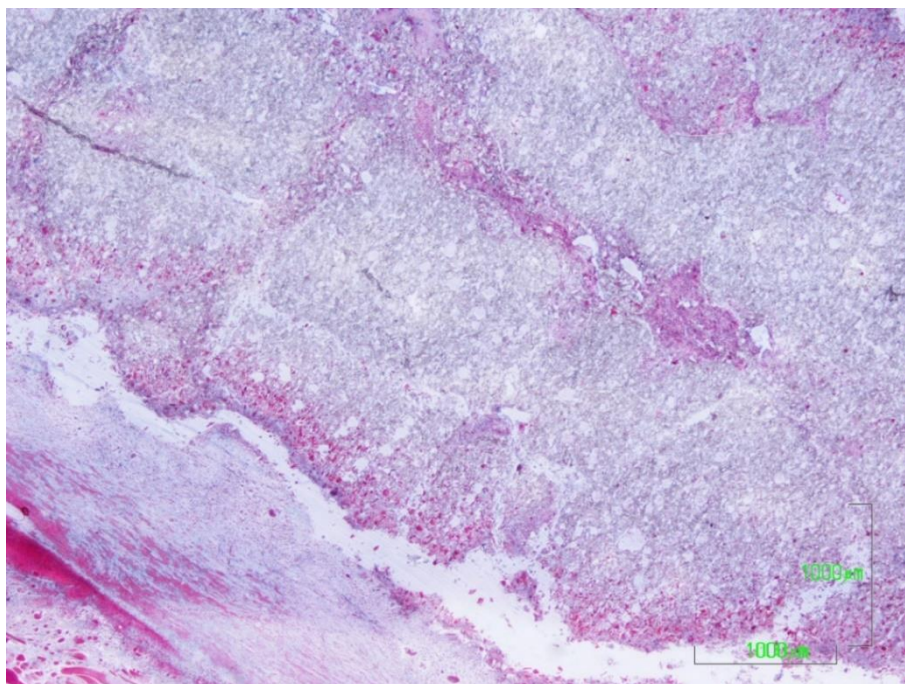


Fig H4. Defecto óseo ocupado en su mayoría por restos de material. 2x

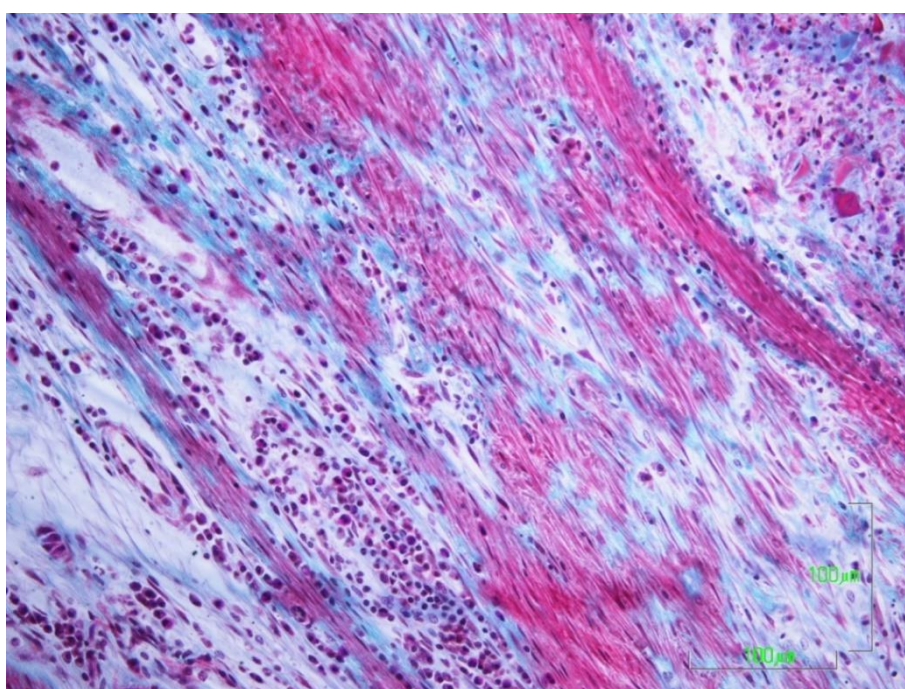


Fig H5. Formación fibrosa que rodea los restos de material. Destaca la presencia de macrófagos y células plasmáticas. 20x

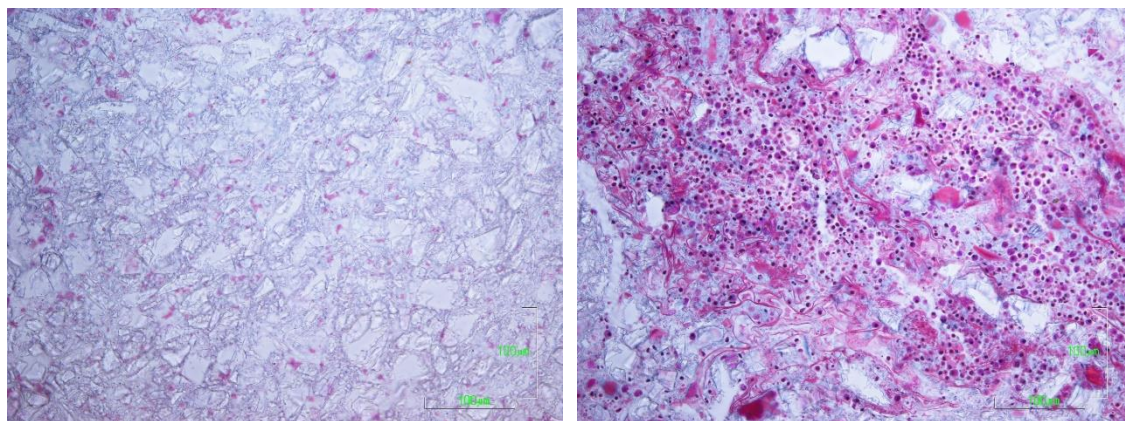


Fig H6. C25. a) Restos de material sin presencia de células. b) Tejido necrótico con procesos de cariorexis entre los restos de material. 20x.

○ Grupo B+O

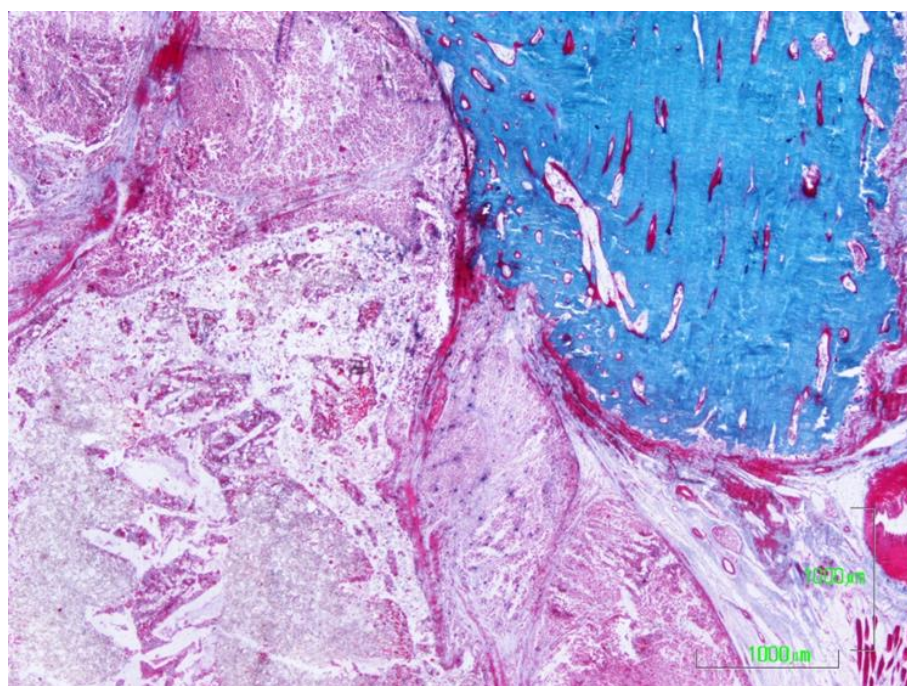


Fig H7. C14. Hueso quiescente adyacente al defecto ocupado por formación de tejido conectivo y restos de material. 2x

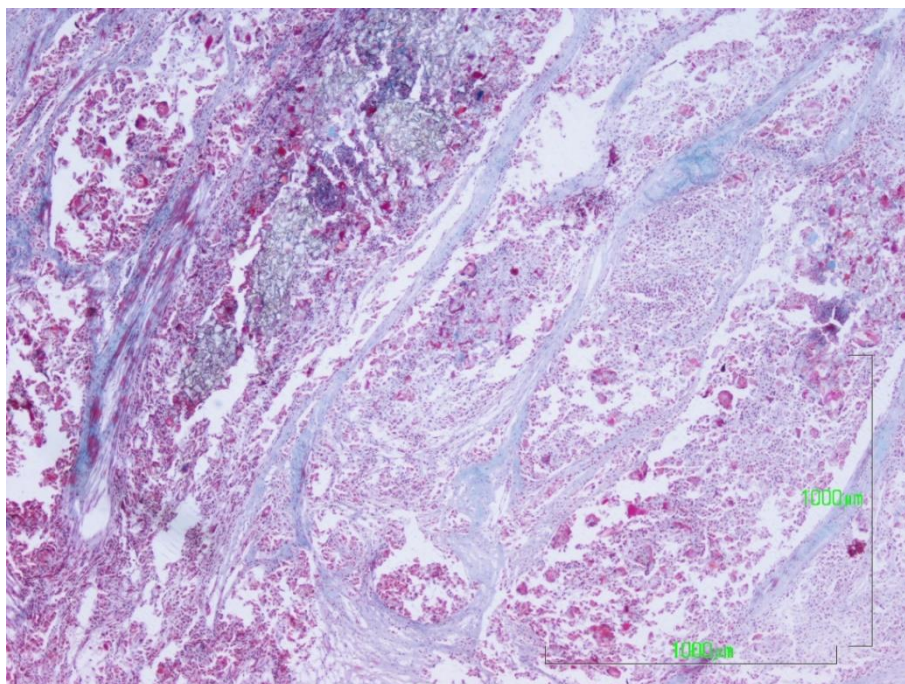


Fig H8. Formación conectiva a modo de tabiques en el tejido de granulación junto con restos de material. 4x

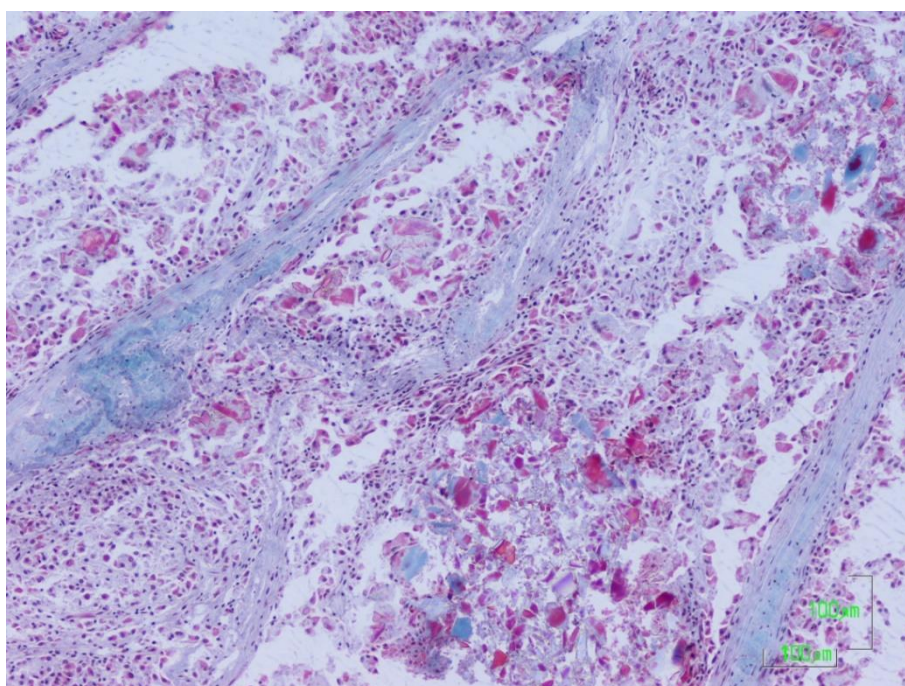


Fig H9. C16. Reacción inflamatoria crónica junto a restos de material y tejido conectivo inmaduro en forma de tabiques. 10x

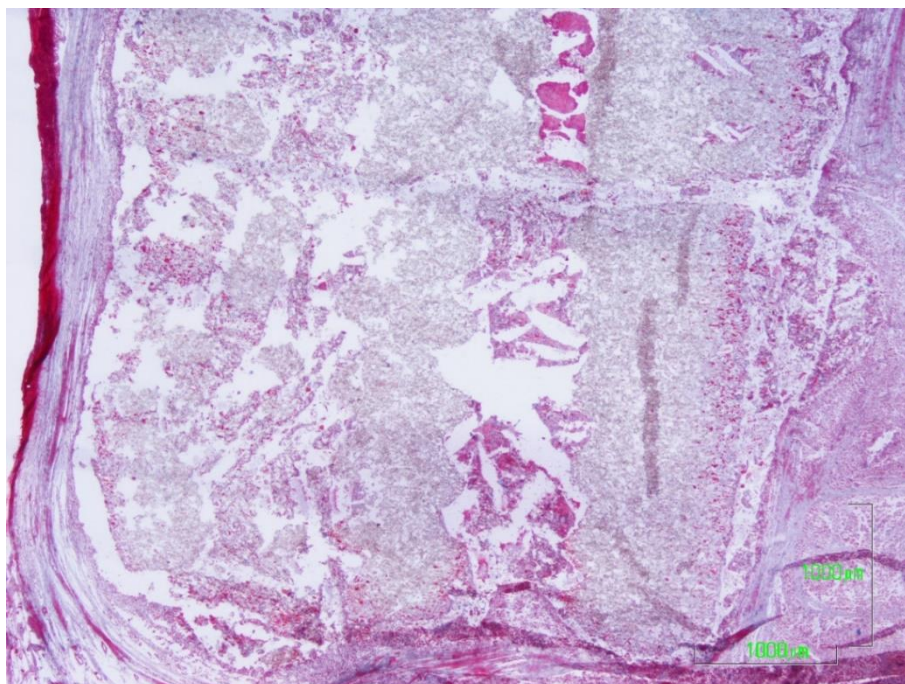


Fig H10. Formación de una cápsula fibrosa alrededor de los numerosos restos de material. 2x

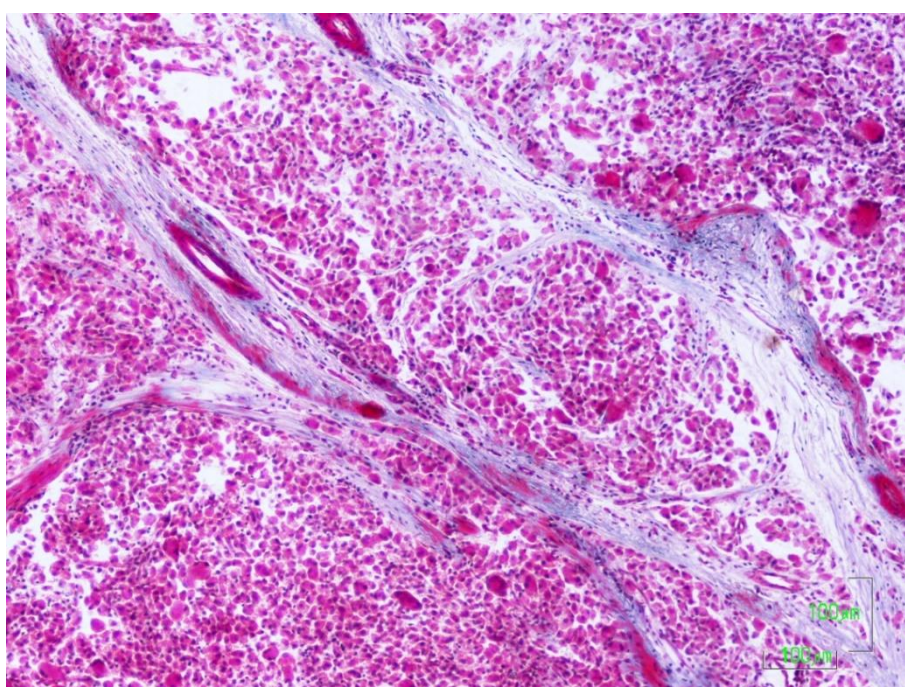


Fig H11. Respuesta inflamatoria crónica formada predominantemente por células plasmáticas y macrófagos, con alguna célula multinucleada. Presencia de tejido conectivo inmaduro a modo de tabiques. 10x

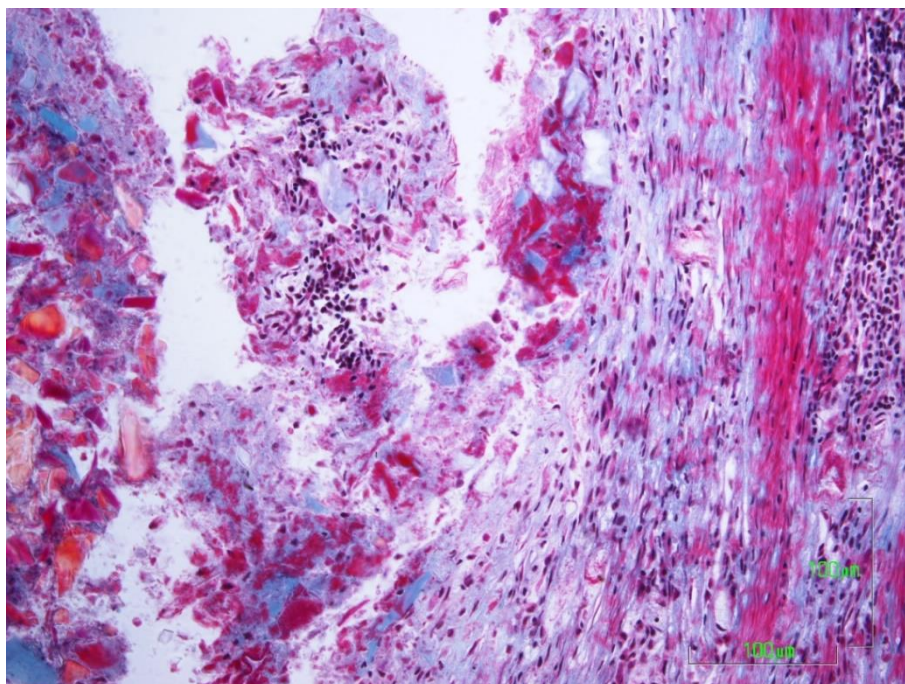


Fig H12. Reacción inflamatoria crónica caracterizada por la presencia de células plasmáticas y macrófagos en asociación con restos de material delimitados por tejido conectivo. 20x

○ Grupo B+C+O

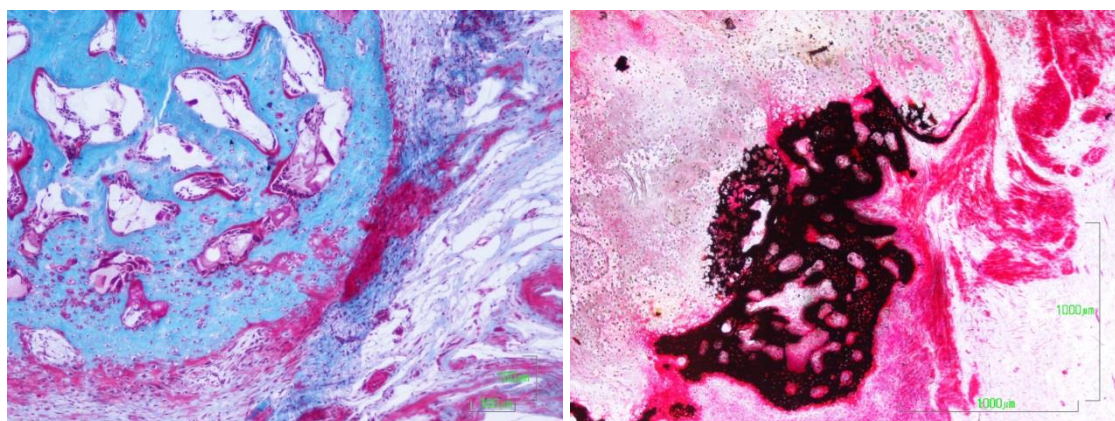


Fig H13. Hueso regenerado inmaduro, con aspecto apolillado con extensas lagunas vasculares. Se aprecian osteocitos inmaduros y procesos de remodelación. a) TG 10x, y b) VK 4x

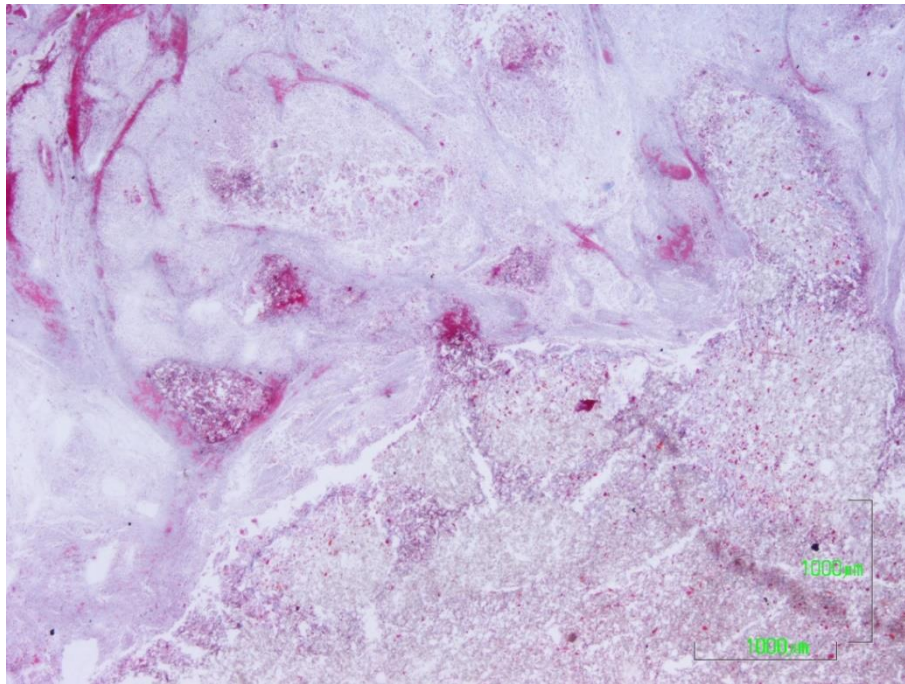


Fig H14. Panorámica del tejido de granulación y grandes acúmulos de restos de material sin reacción celular asociada. 2x. (En dos de los casos de este grupo, encontramos grandes acúmulos de material en la zona central del defecto, sin ningún tipo de interacción celular)

Seguimiento de 12 semanas

- Grupo control: B (una única muestra)

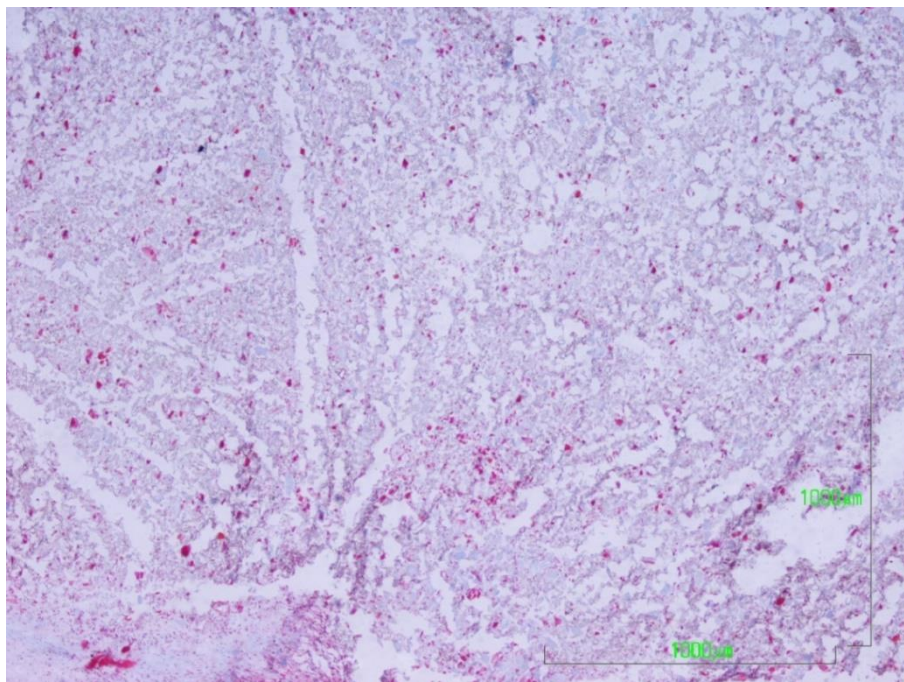


Fig H15. C5. Restos de material quiescentes. Ausencia de respuesta inflamatoria. Escasa o nula celularidad. 4x

○ Grupo B+C

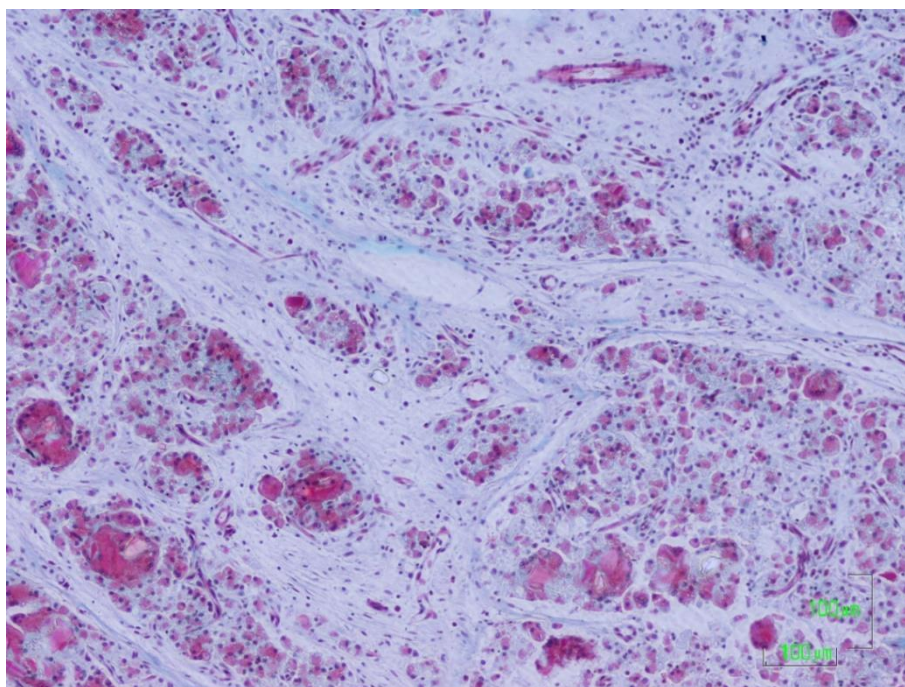


Fig H16. Tejido conectivo en asociación a macrófagos y células multinucleadas englobando restos de material. 10x

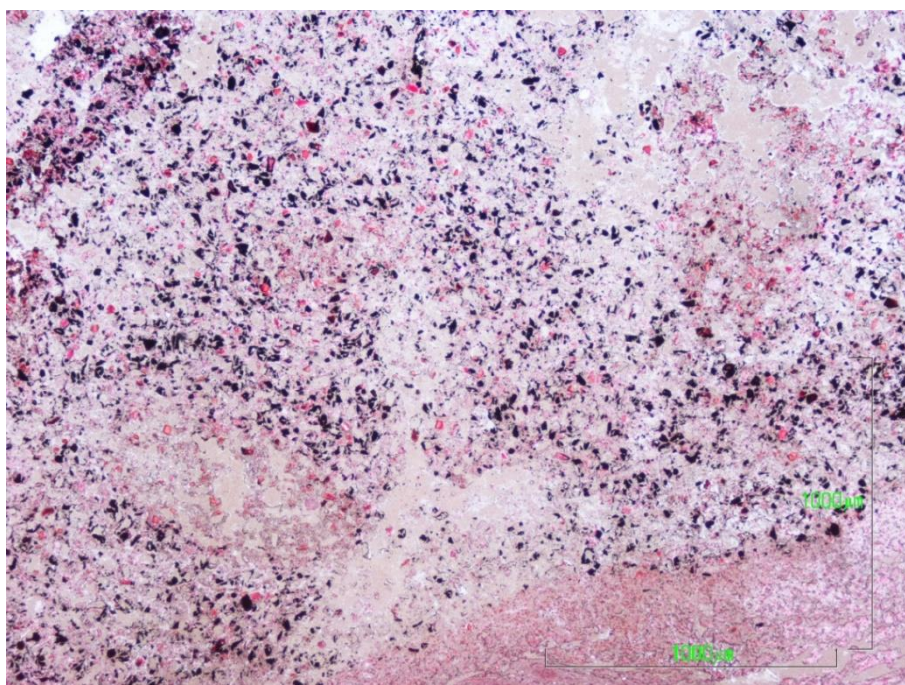


Fig H17. Restos de material presentes en el defecto óseo que adquieren coloración negra por presencia de calcio en su composición (TVK) 4x

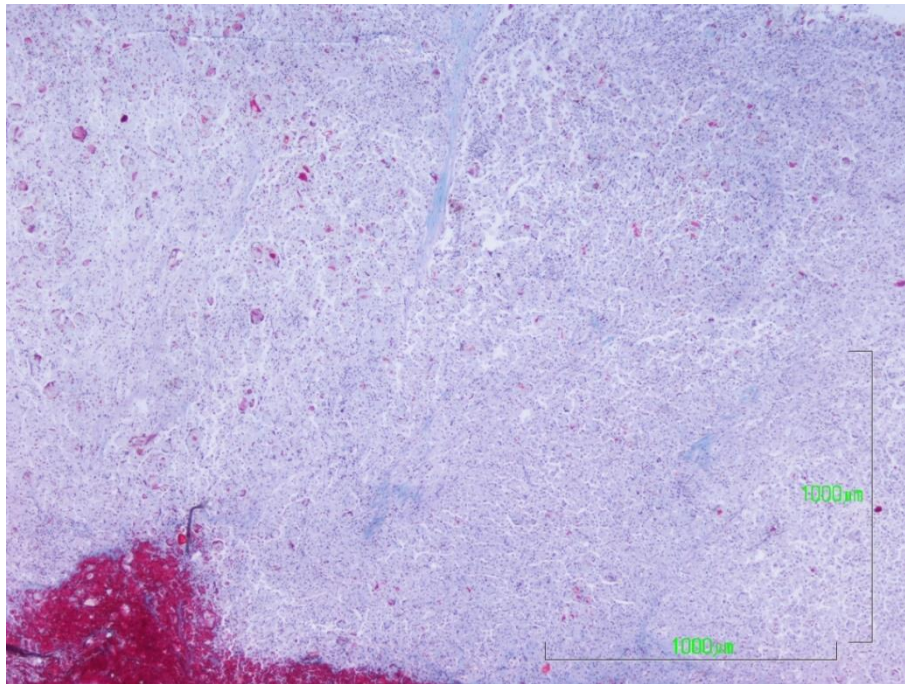


Fig H18. C20. Panorámica de la cavidad del defecto ocupa en su totalidad por células, siendo macrófagos y células multinucleadas. Escaso desarrollo de tejido conectivo. 4x

○ Grupo B+O

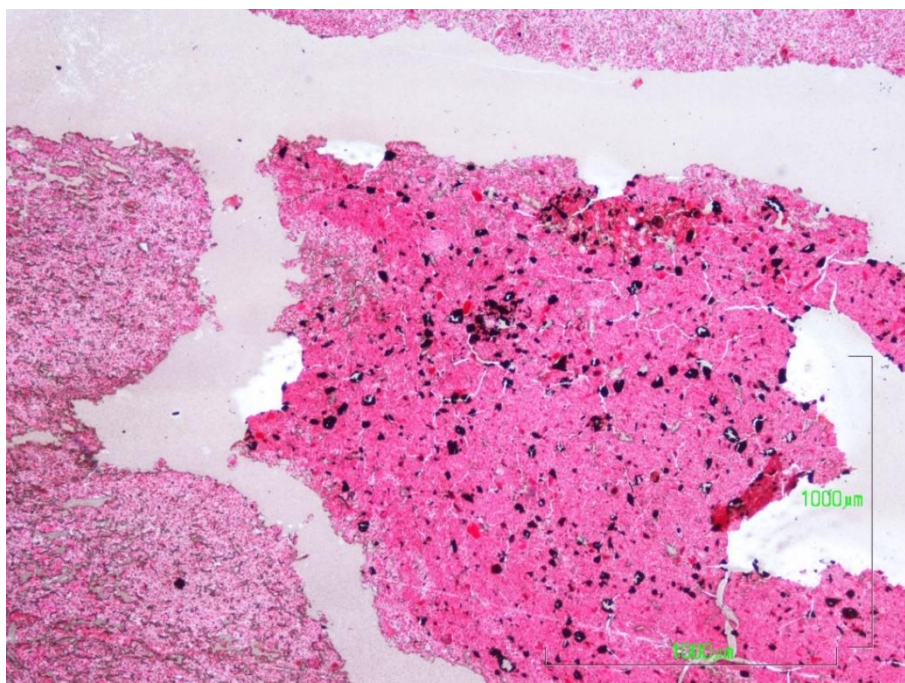


Fig H19. C24. Panorámica de la cavidad del defecto donde encontramos tejido necrótico en asociación con restos de material que presentan escasa coloración negra, debido a la ausencia de calcio en su composición. VK 4x

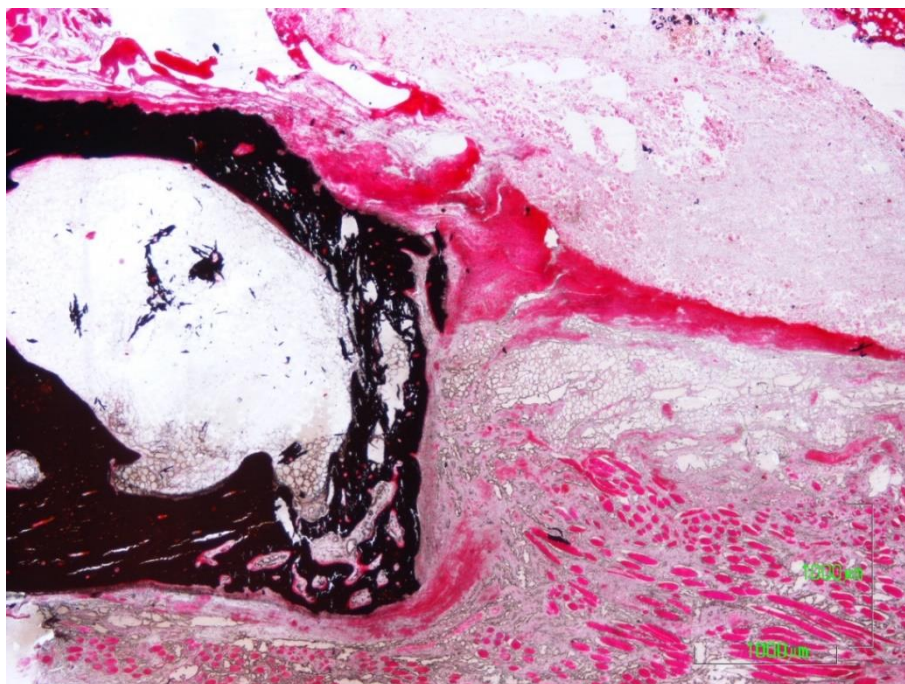


Fig H20. Panorámica de la formación de un puente óseo continuo entre los extremos óseos del defecto. 2x

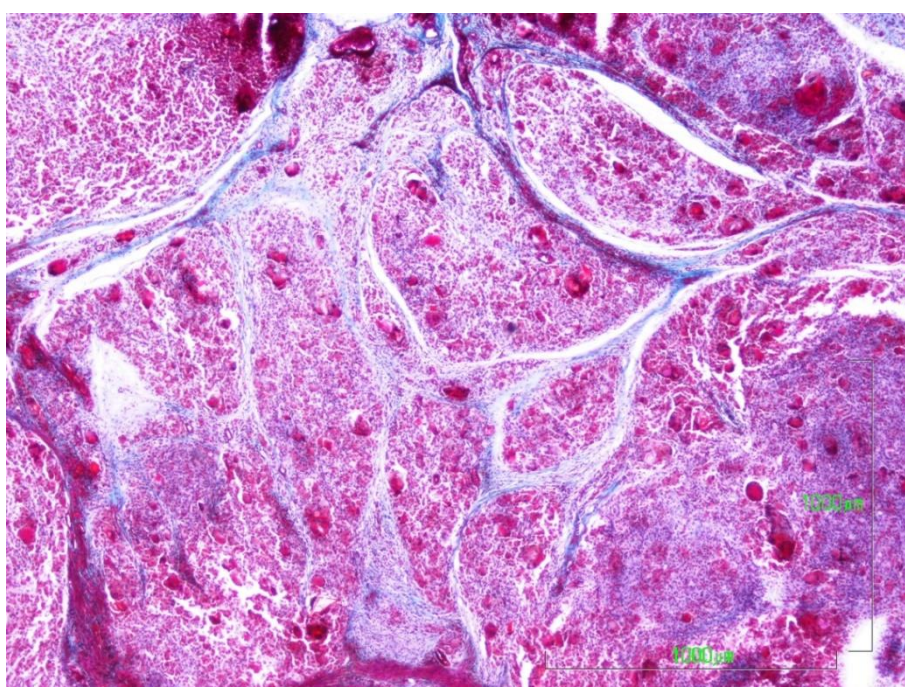


Fig H21. Tejido de granulación con gran presencia de celularidad, sobre todo macrófagos y células gigantes multinucleadas. 4x

○ Grupo B+C+O

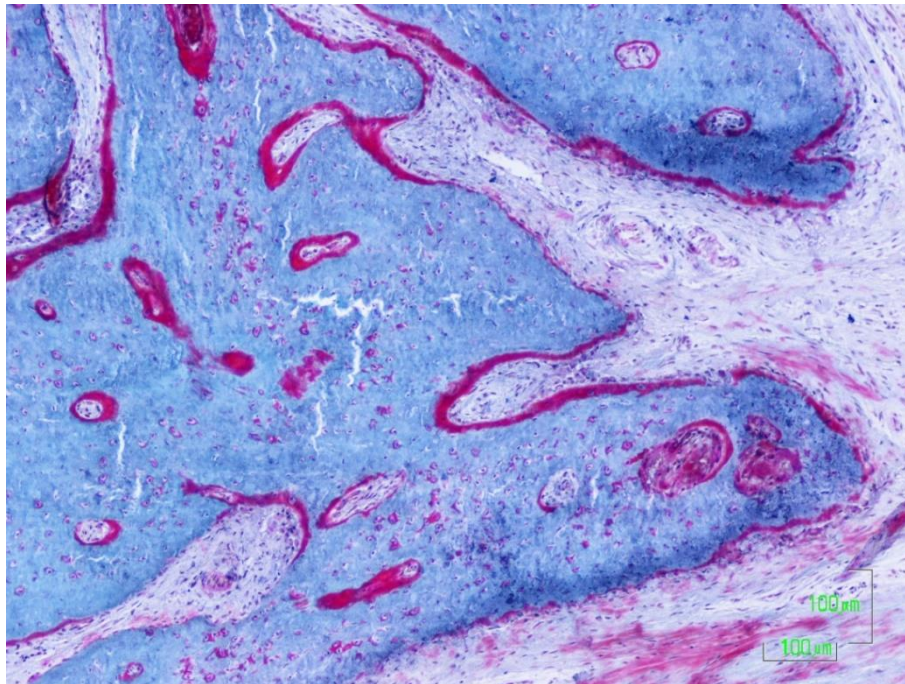


Fig H22. C7. Hueso regenerado inmaduro, con aspecto apollado por falta de calcificación en las cavidades de los osteocitos. Superficies óseas con ribetes de osteoide y zonas de reabsorción. 10x

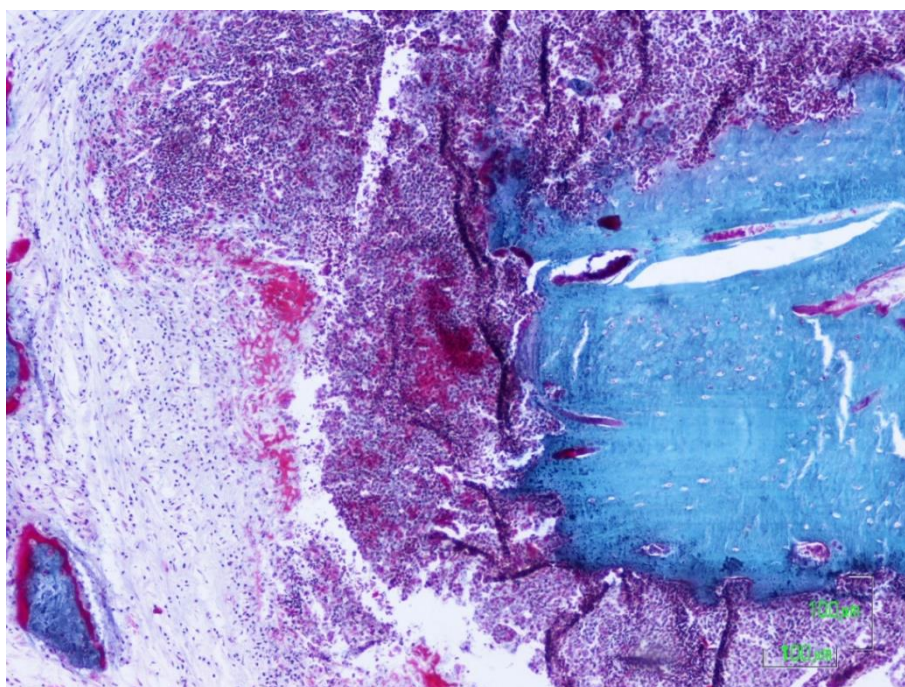


Fig H23. Granuloma en vecindad a una formación ósea. Con gran componente celular, destacando macrófagos y plasmáticas. 10x

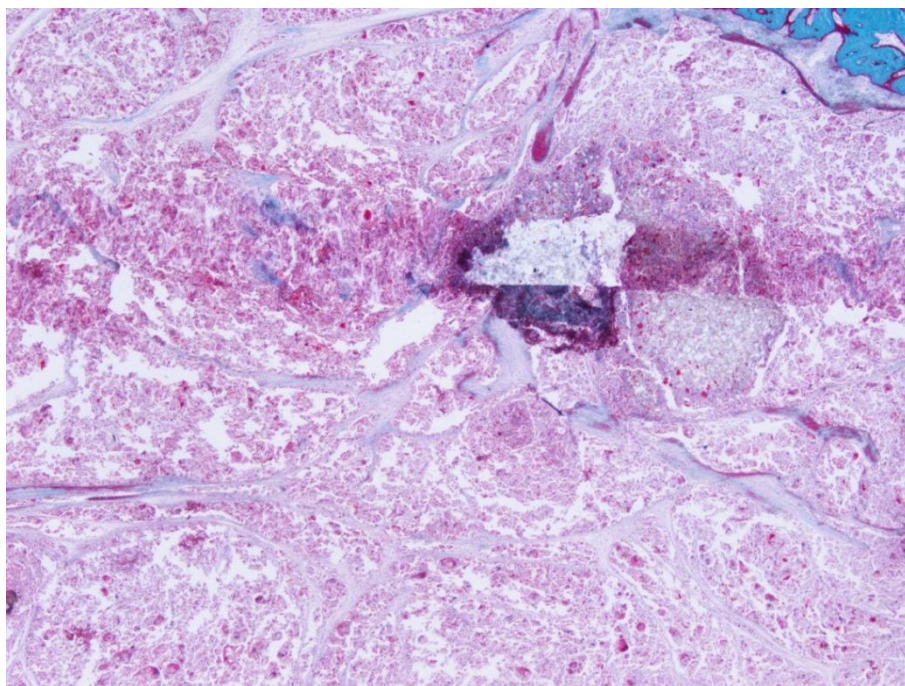


Fig H24. C21. Panorámica de la cavidad del defecto con desarrollo de tejido de granulación. Se aprecian formaciones fibrosas a modo de tabiques junto a una notable reacción celular y restos de material. 2x

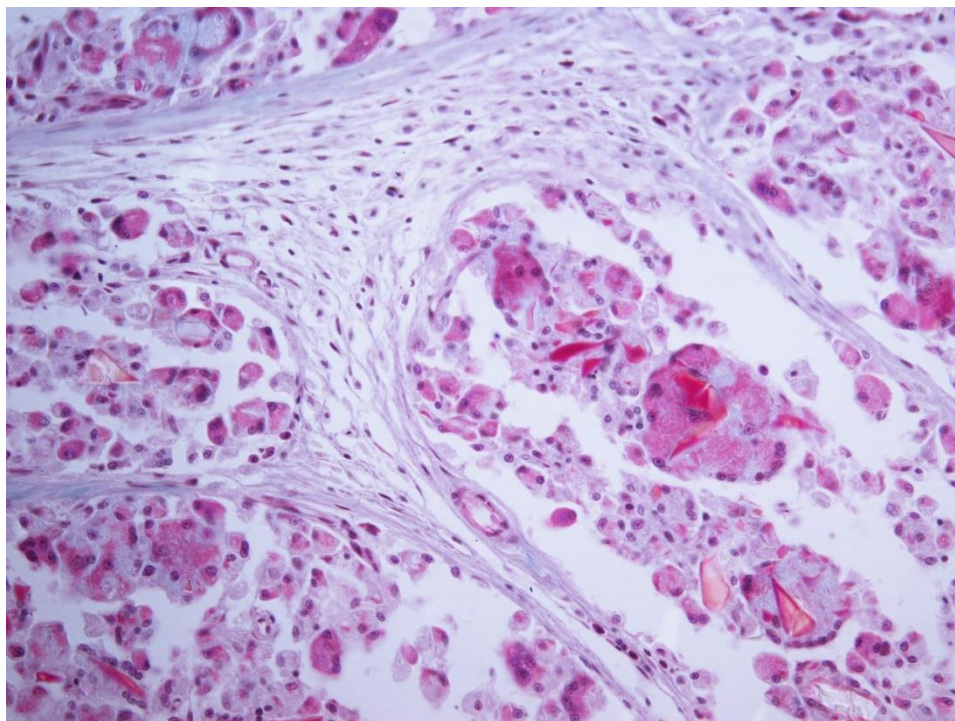


Fig H25. C21. Detalle de asociación de células multinucleadas con restos de material rodeados por tejido conectivo.

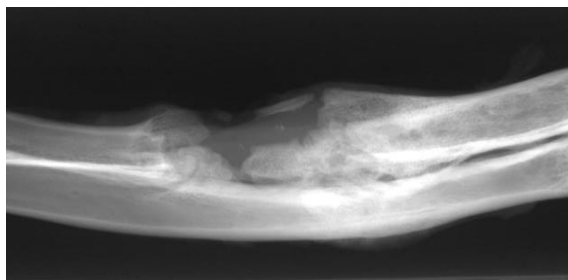
20x

ANÁLISIS DE IMAGEN

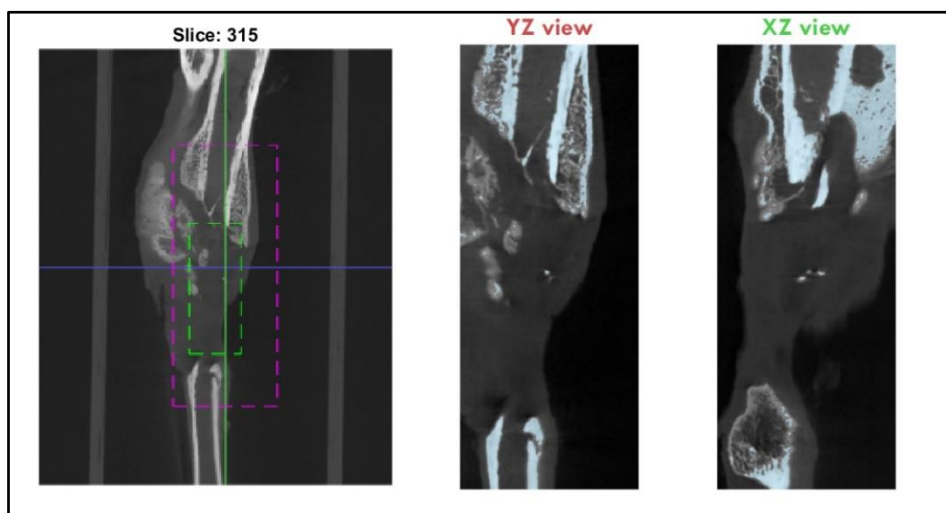
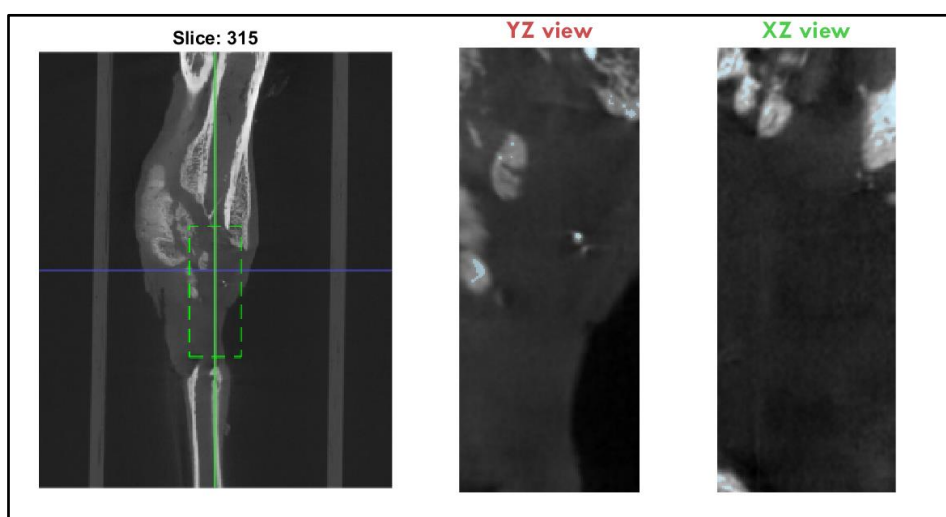
A continuación, se exponen imágenes de radiografía y micro-CT disponibles de todas las piezas estudiadas.

- Grupo B+O. 6 semanas

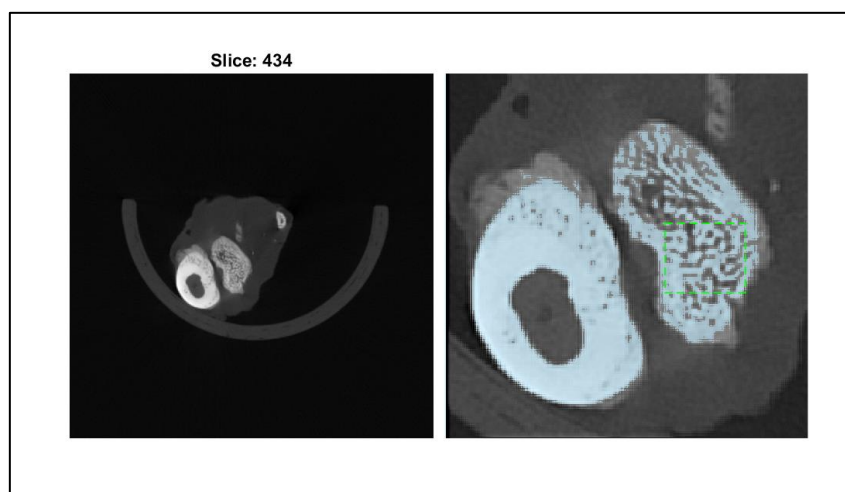
C8: H106580057



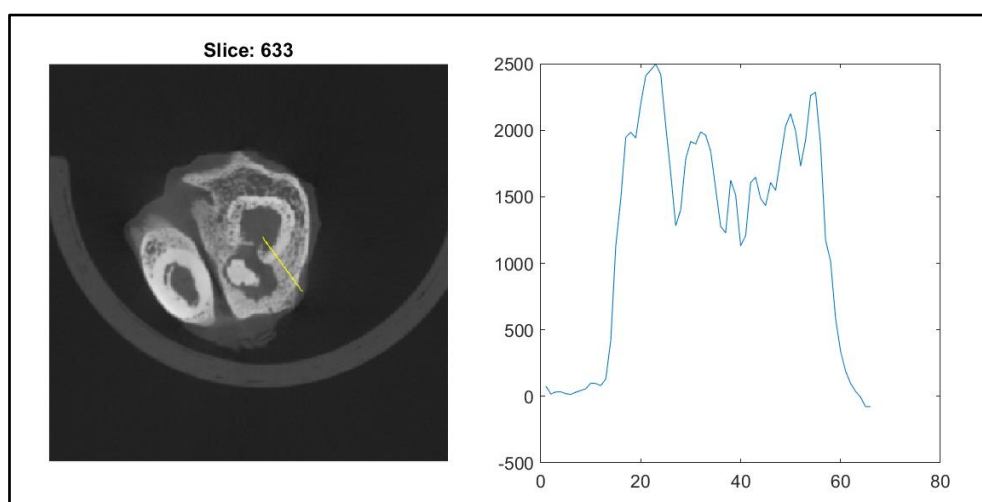
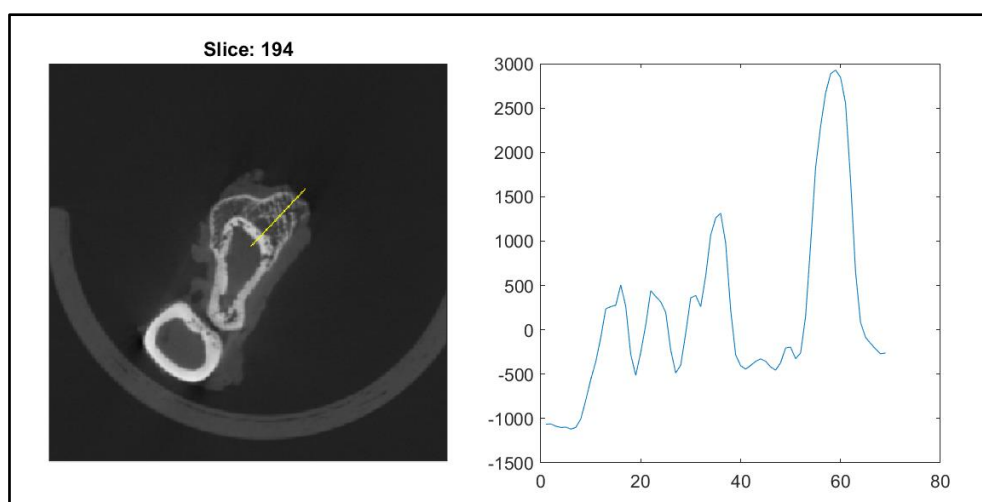
BV/TV

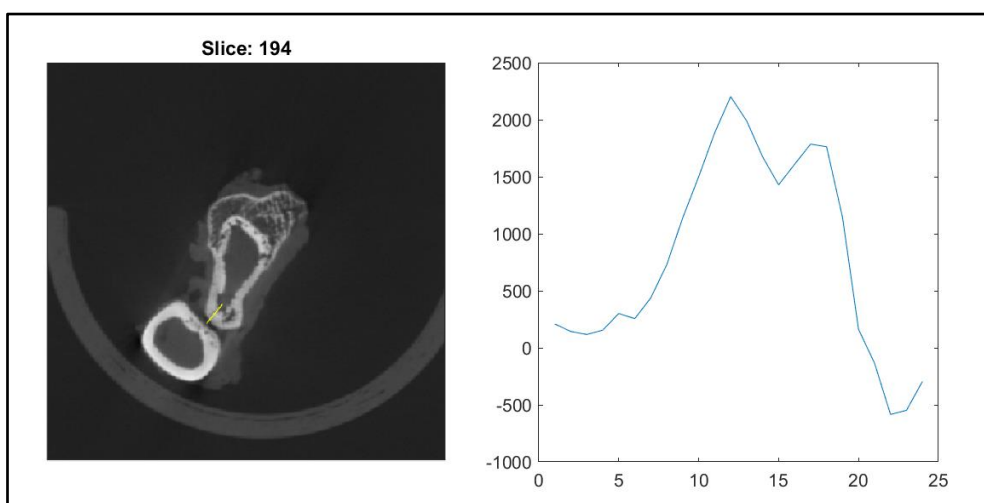
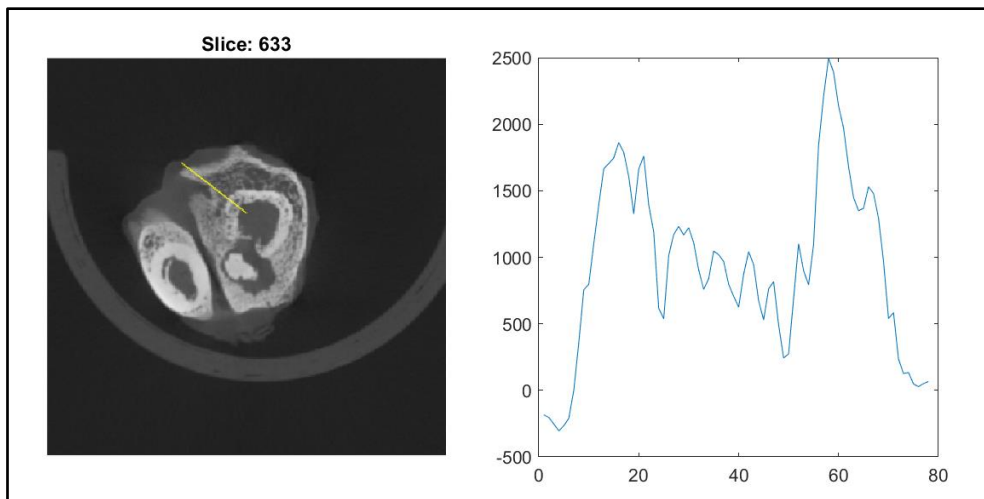


Estudio trabecular



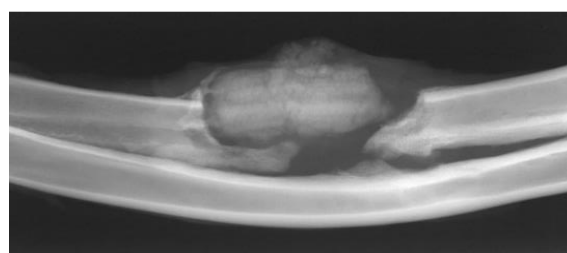
Estudio cortical



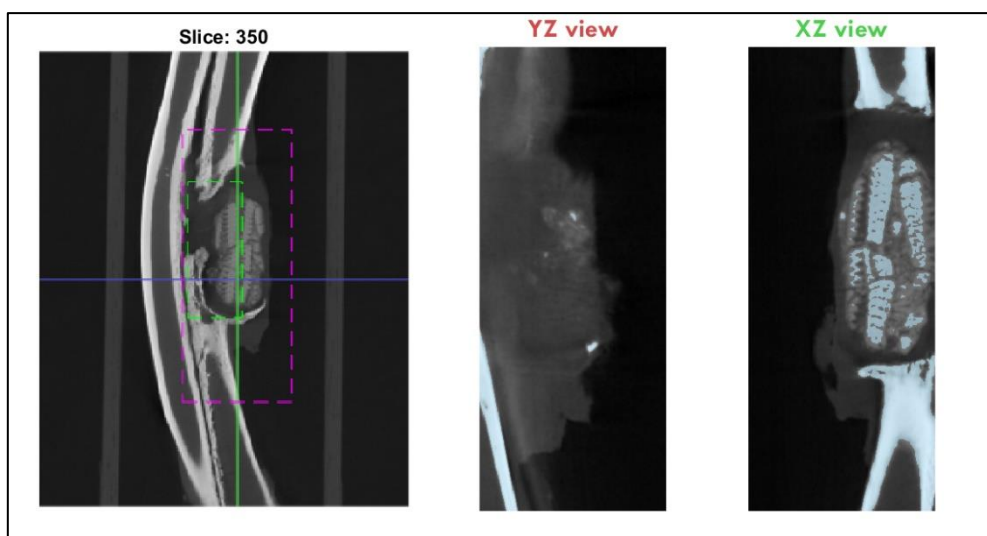
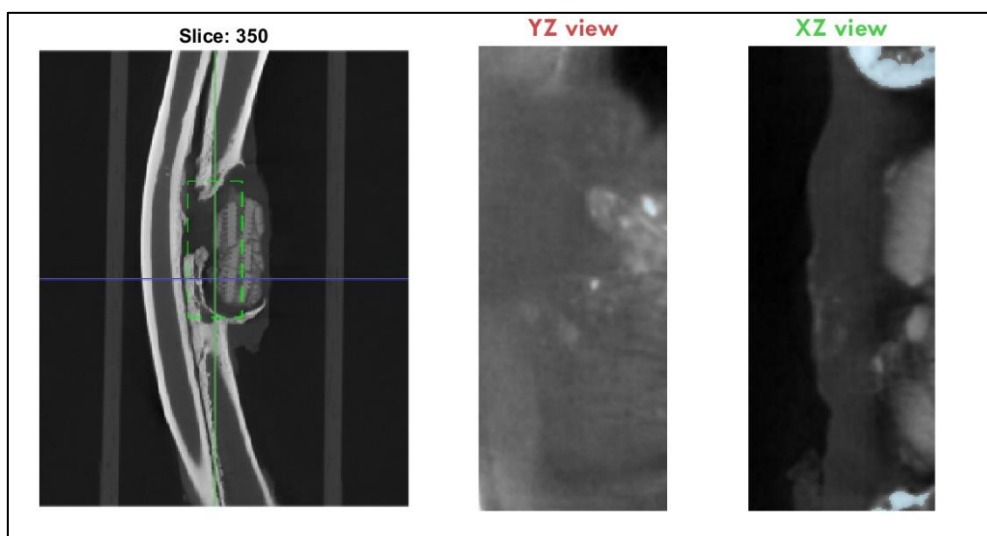


Pixel size (m		0,058													
id	Study name	ROI position	ROI size - X Y	BV(px)	TV(px)	BV/TV	Threshold	Radio	ROI trabecul	ROI cortical s	Tb.N	Tb.Th(mm)	Tb.Sep(mm)	Cortical.Th(n	
0	CT_0057_id_	434	192.5428	2	4365	7708	0,56629476	136,402863	3	255.3272	173.3823	92	0,04769268	0,69314168	0,52297775
1	CT_0057_id_	633	110.1053	129.4474	467.8947	467.8947				267.0963	343.437	254.4245	313.527		3,63109762
2	CT_0057_id_	633	110.1053	129.4474	467.8947	467.8947				359.4439	406.2334	334.4591	398.4868		2,60425217
3	CT_0057_id_	194	100.8947	72.64912	466.6667	466.6667				401.1579	337.2982	220.6316	288.1754		1,73935105
4	CT_0057_id_	194	100.8947	72.64912	466.6667	466.6667				306.5965	288.1754	356.9474	379.0526		0,69521826
5	CT_0057_id_	315	298.2759	2	184298	2487163	0,07409969								
6	CT_0057_id_	315	266.1517	1	2630847	11927434	0,22057108								

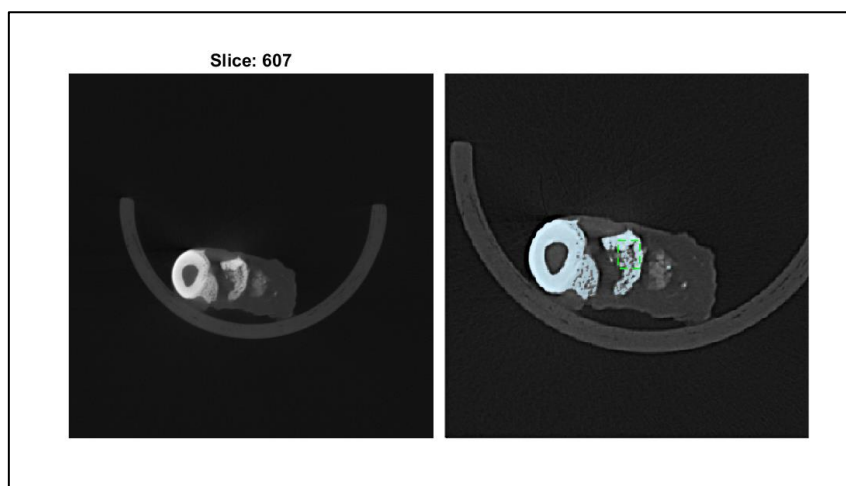
C14: H81143



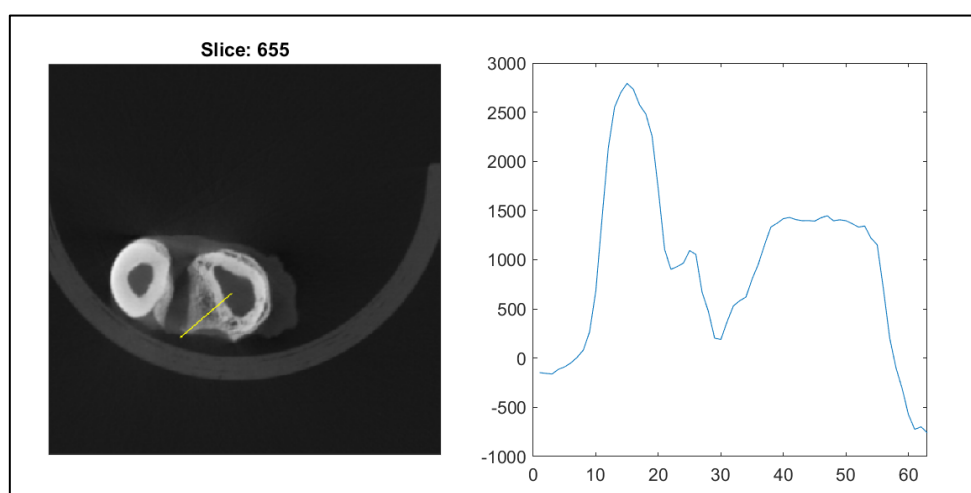
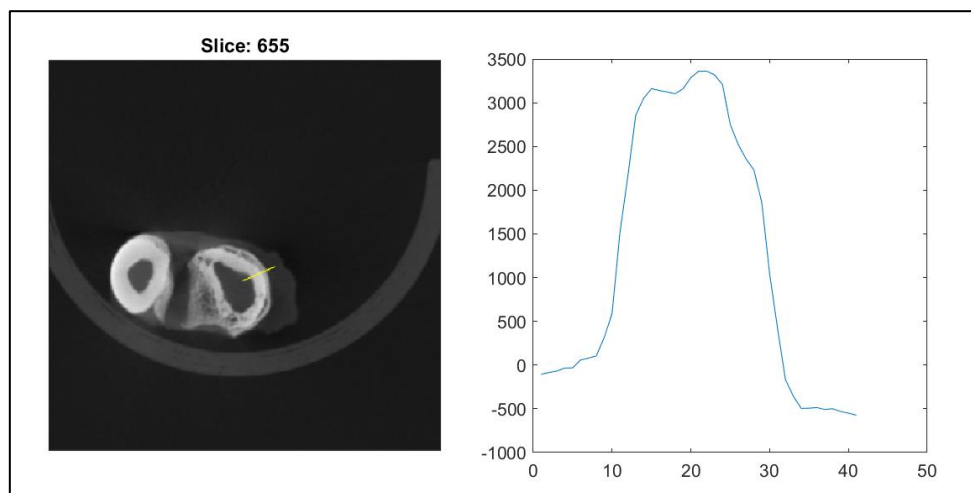
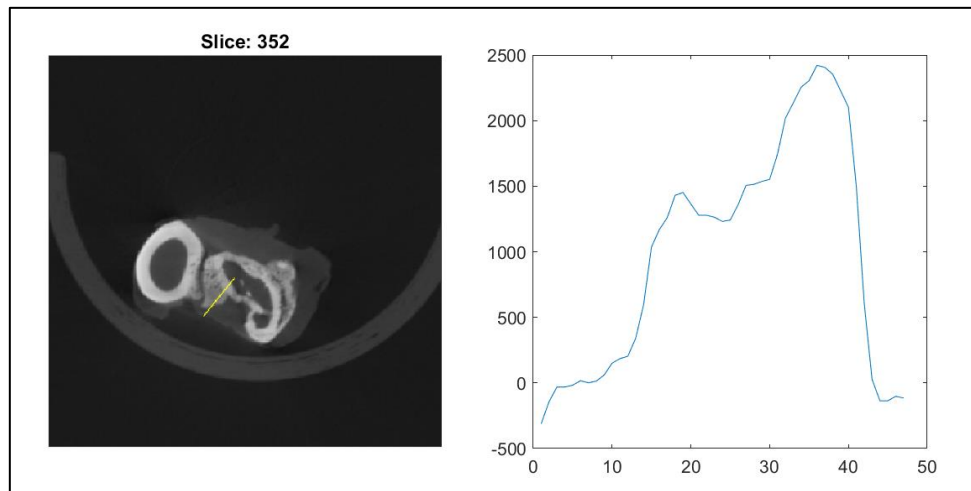
BV/TV

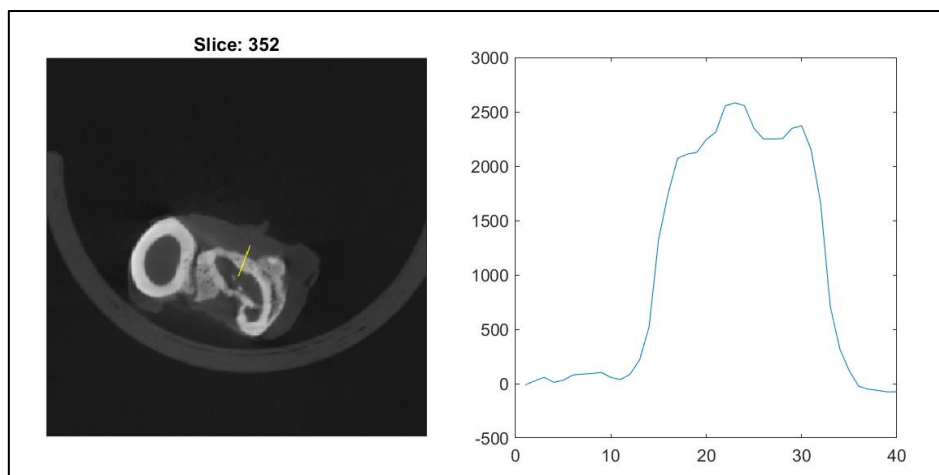


Estudio trabecular



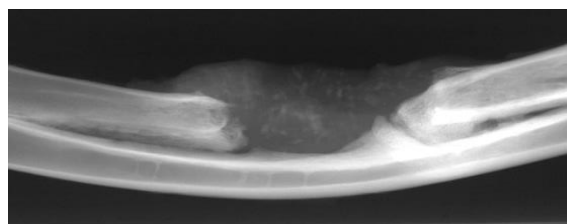
Estudio cortical



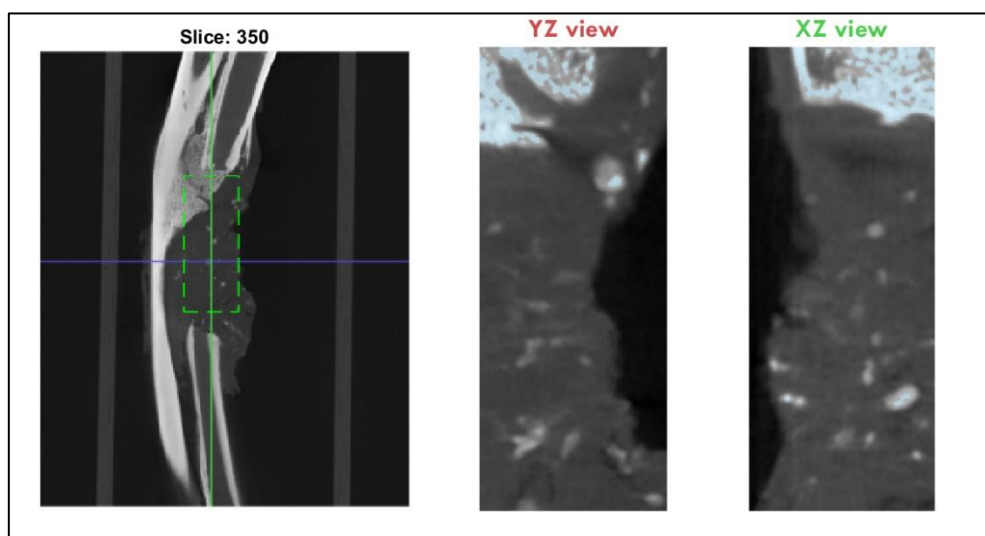


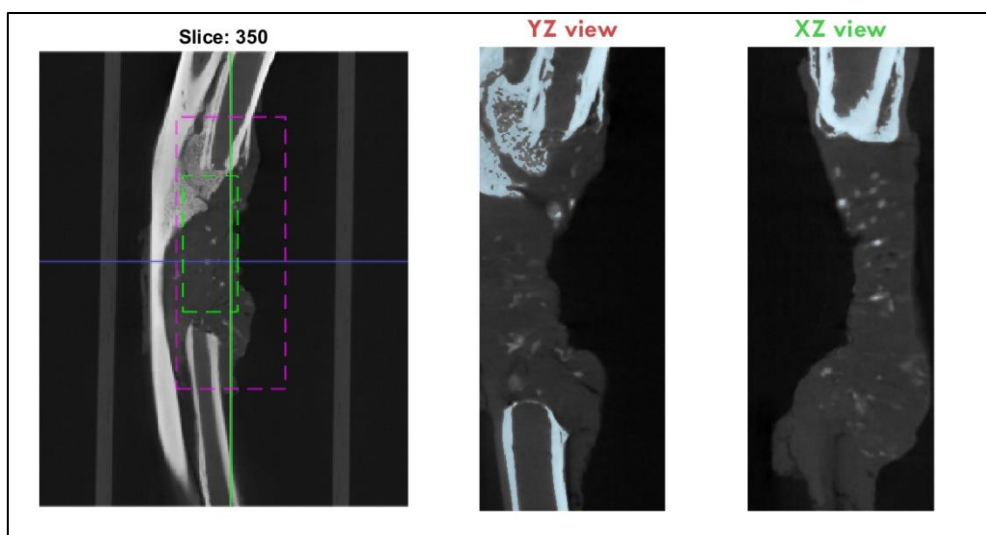
Pixel size (m	0,058														
id	Study name	ROI position	ROI size -X Y	BV(px)	TV(px)	BV/TV	Threshold	Radio	ROI trabecul	ROI cortical s	Tb.N	Tb.Th(mm)	Tb.Sep(mm)	Cortical.Th(n	
0	CT_h81143_i	607	90.56334	1	516	918	0,5620915	131,82776	3	200.4579	193.3348	25	0,0393683	0,8256	0,64766667
1	CT_h81143_i	655	131.5965	130.9825	466.6667	466.6667					349.5789	288.1754	405.4561	458.2632	2,7000958
2	CT_h81143_i	655	131.5965	130.9825	466.6667	466.6667					361.8596	401.1579	395.6316	378.4386	1,18222668
3	CT_h81143_i	352	101.5088	123.614	466.6667	466.6667					285.1053	321.9474	434.9298	389.4912	1,66150479
4	CT_h81143_i	352	101.5088	123.614	466.6667	466.6667					351.421	336.6842	355.1053	393.1754	1,12918564
5	CT_h81143_i	350	281.4759	3	250534	1790025	0,13996117								
6	CT_h81143_i	350	271.7517	1	1716814	8643311	0,19862921								

C16: 900046000192230

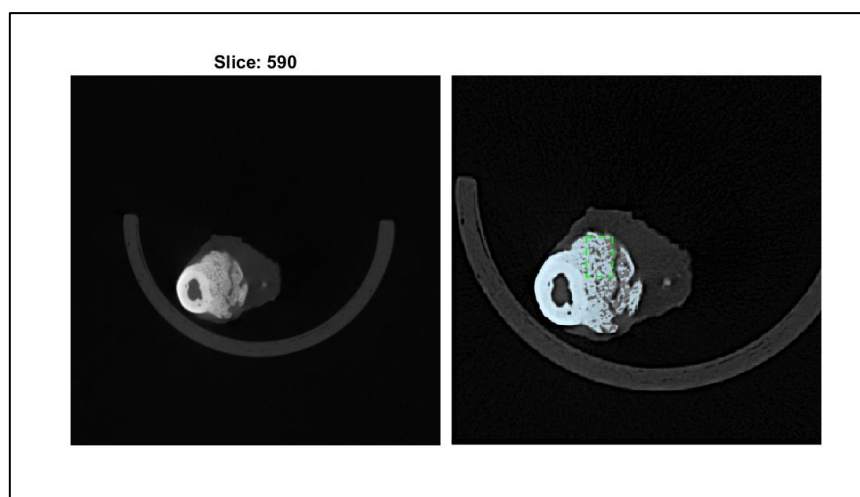


BV/TV

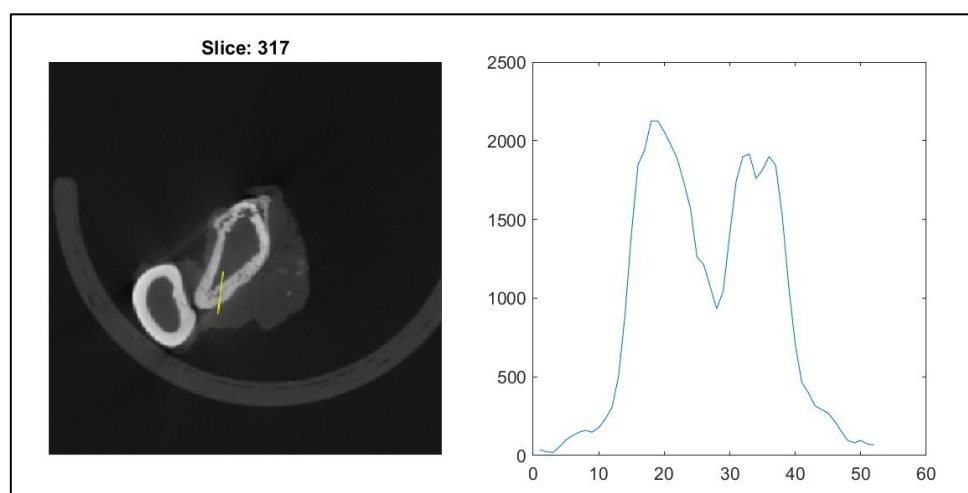


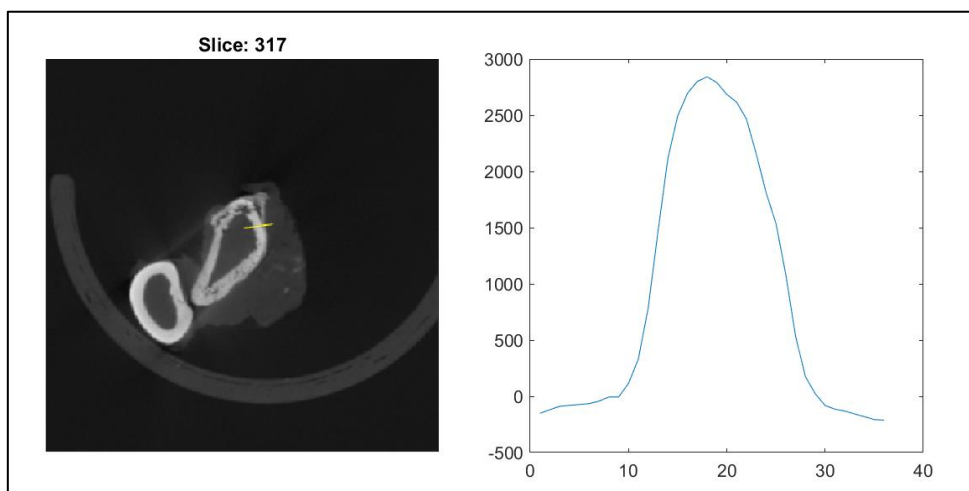
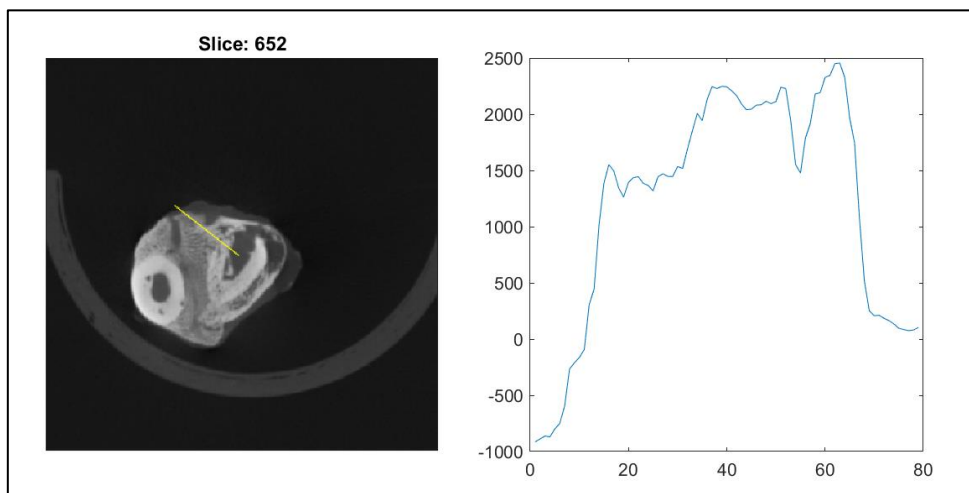
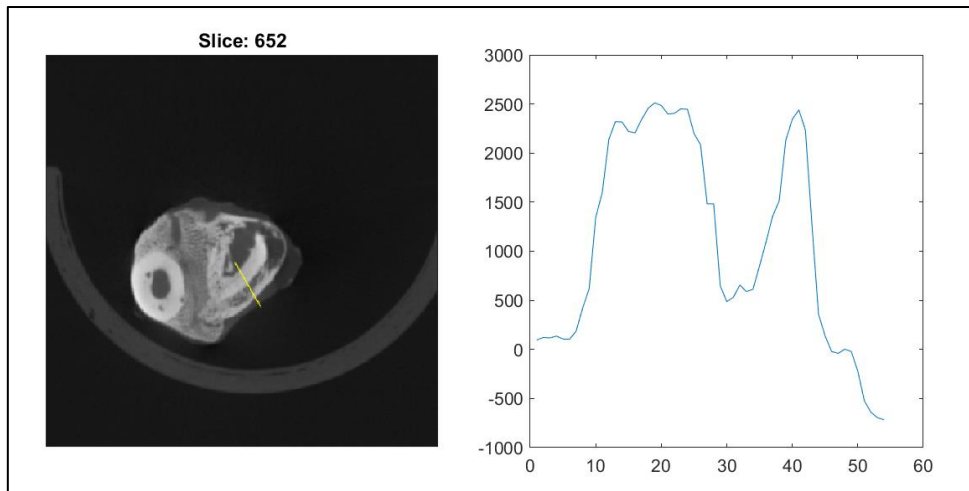


Estudio trabecular

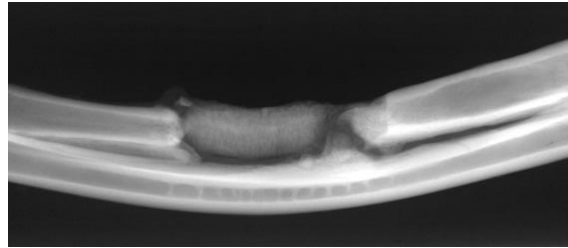


Estudio cortical

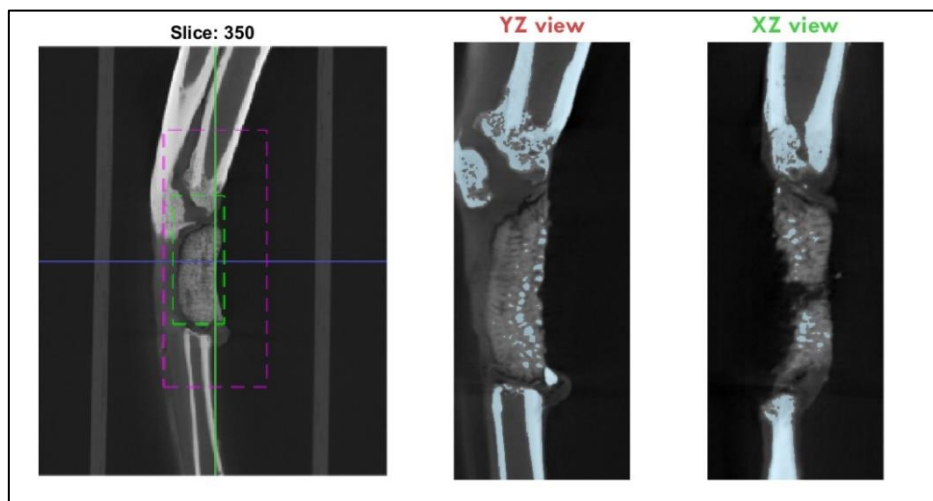
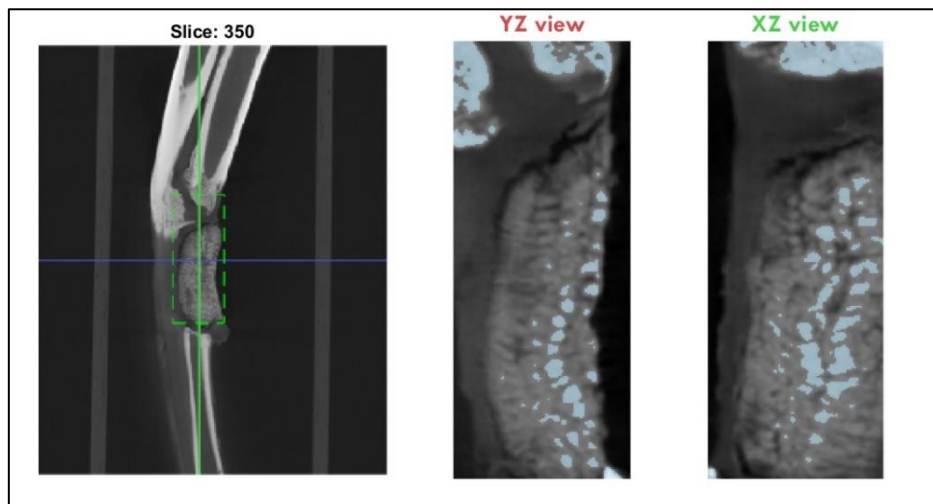




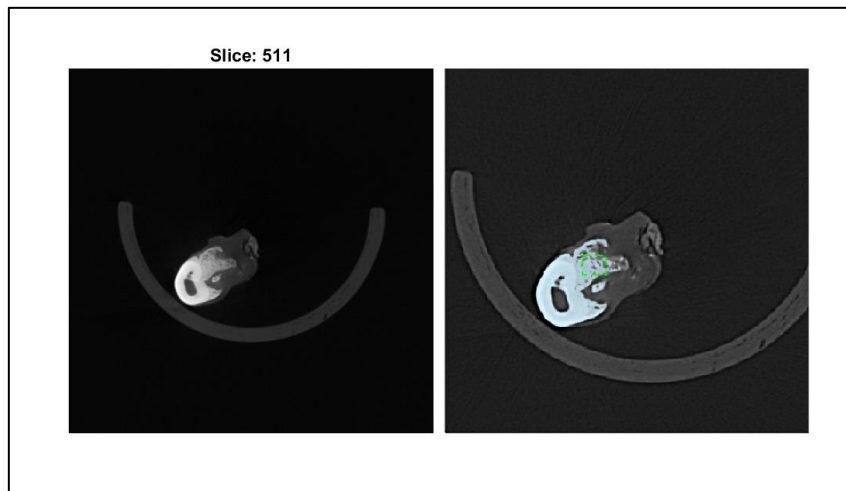
Pixel size (m		0,058													
id	Study name	ROI position	ROI size -X Y	BV (px)	TV (px)	BV/TV	Threshold	Radio	ROI trabecul	ROI cortical	s Tb.N	Tb.Th (mm)	Tb.Sep (mm)	Cortical.Th (n	
0	CT_2230_id_	590	0.5	0.5	922	1457	0,63280714	135,857084	3	154.0172	184.3966	29	0,05768313	0,6663676	0,33912568
1	CT_2230_id_	652	111.3333	129.1404	466.6667	466.6667					264.2281	341.5965	304.1404	364.3158	3,17083717
2	CT_2230_id_	652	111.3333	129.1404	466.6667	466.6667					336.6842	367.386	376.5965	429.4035	2,02781404
3	CT_2230_id_	317	90.45614	125.4561	466.6667	466.6667					297.386	291.2456	375.3684	425.7193	1,62523566
4	CT_2230_id_	317	90.45614	125.4561	466.6667	466.6667					325.6316	360.0175	327.4737	322.5614	0,88960811
5	CT_2230_id_	350	273.0759	3	179682	2123326	0,0846229								
6	CT_2230_id_	350	260.5517	2	1853424	8552867	0,21670207								

C31: H 71544

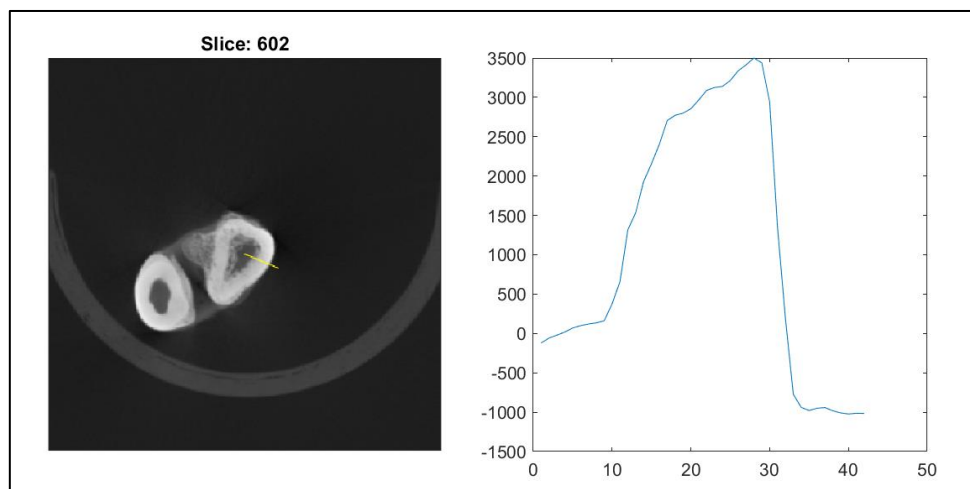
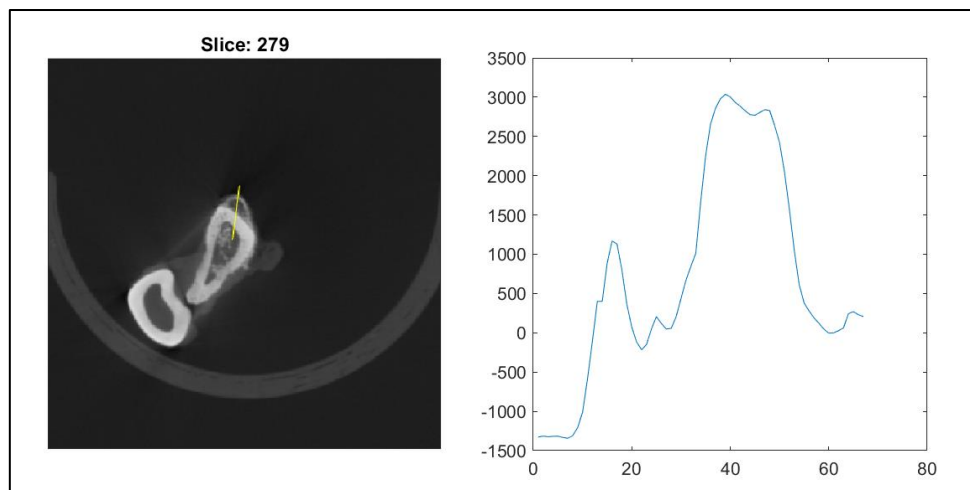
BV/TV

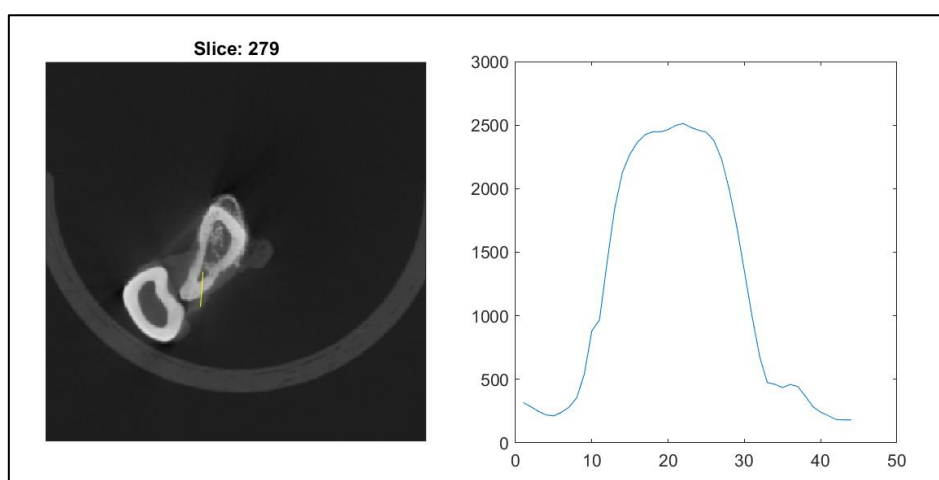
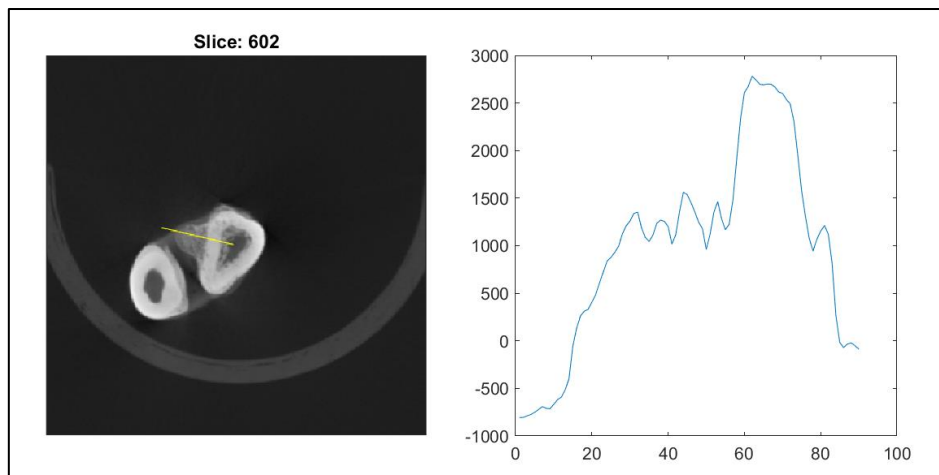


Estudio trabecular



Estudio cortical

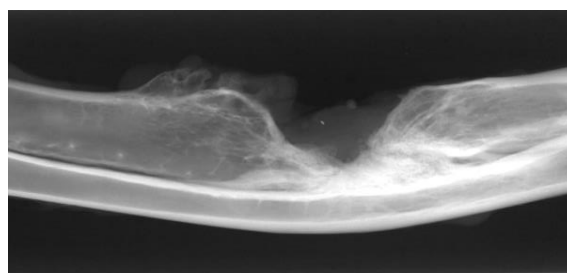




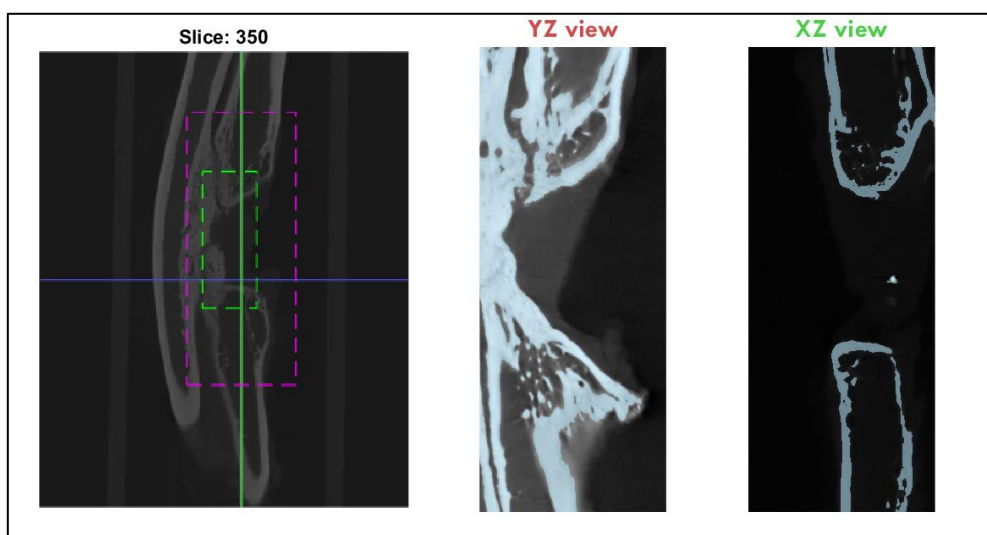
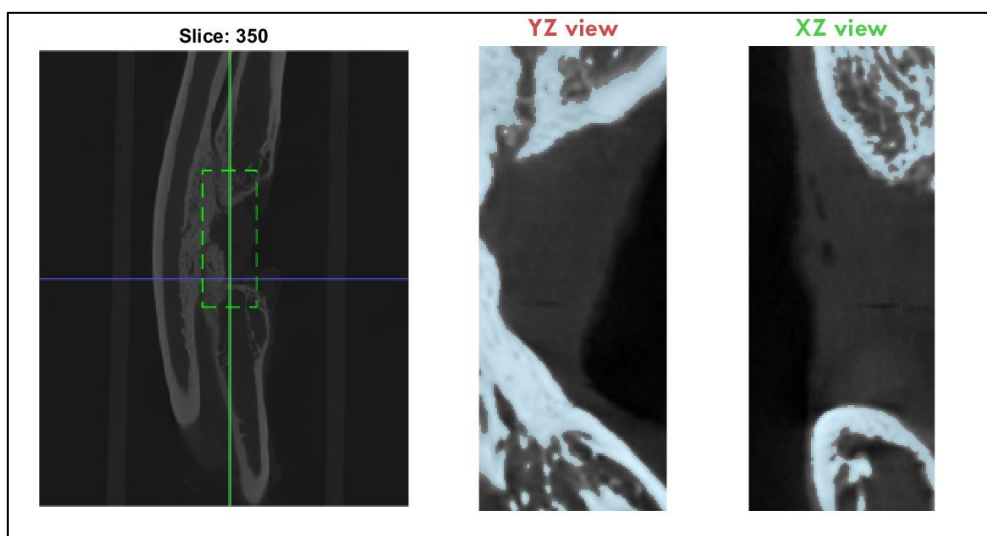
Pixel size (m		0,058													
id	Study name	ROI position	ROI size	-X Y	BV(px)	TV(px)	BV/TV	Threshold	Radio	ROI trabecul	ROI cortical	s Tb.N	Tb.Th(mm)	Tb.Sep(mm)	Cortical.Th(n
0	CT_71544_id	511	86.68369	1	439	672	0,65327381	140	3	159.5552	216.2802	27	0,04579472	0,86311864	0,40340299
1	CT_71544_id	602	115.6316	122.386	466.6667	466.6667					257.4737	345.8947	334.2281	355.1053	3,52748086
2	CT_71544_id	602	115.6316	122.386	466.6667	466.6667					348.3509	388.8772	355.1053	372.2982	1,18668191
3	CT_71544_id	279	108.8772	121.7719	466.6667	466.6667					336.6842	328.0877	274.6667	339.7544	2,25410941
4	CT_71544_id	279	108.8772	121.7719	466.6667	466.6667					302.2982	298.614	380.2807	423.2632	1,28320016
5	CT_71544_id	350	270.2759	3	219313	1853992	0,11829231								
6	CT_71544_id	350	252.1517	1	2129501	6270745	0,33959298								

○ **Grupo B+O. 12 semanas**

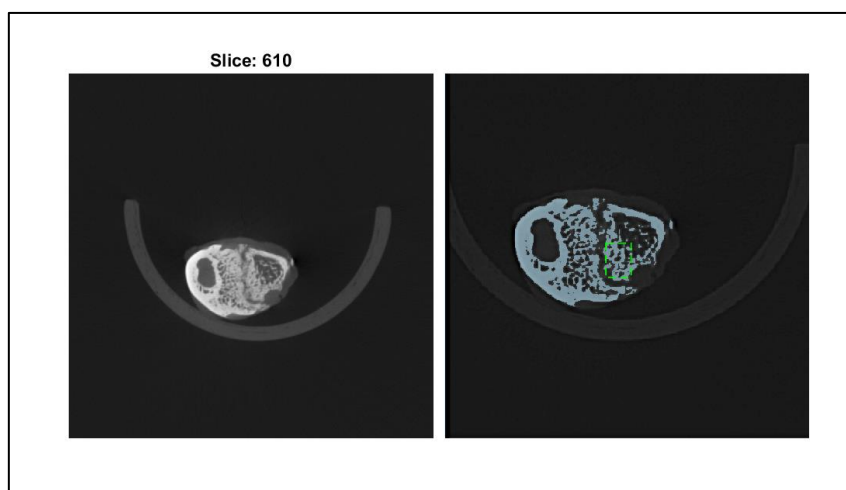
C4: H5777277



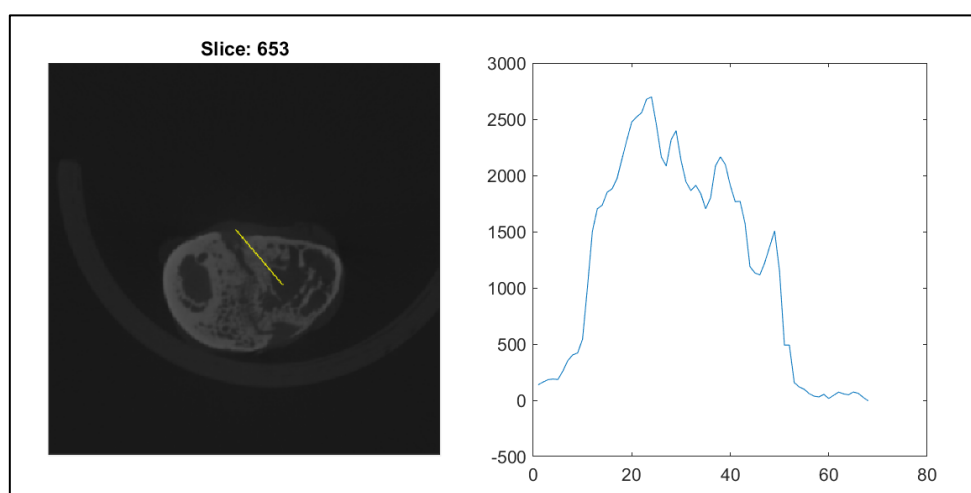
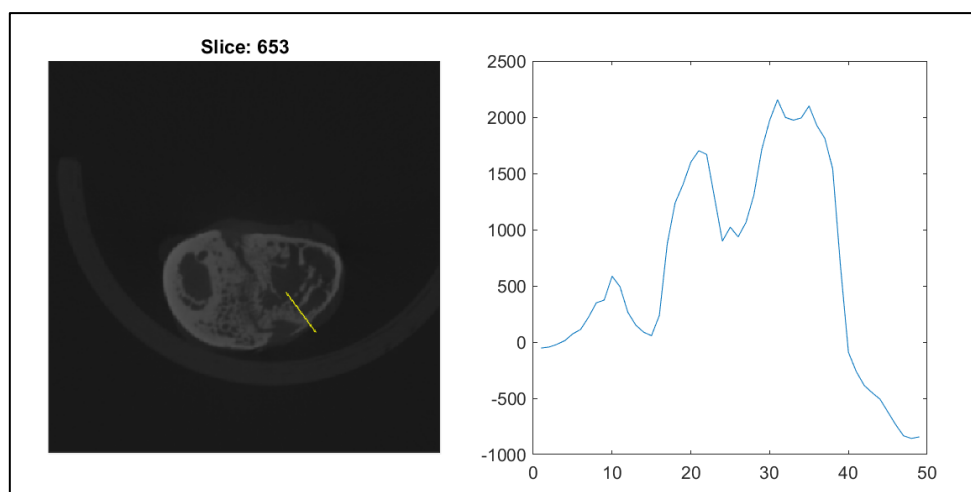
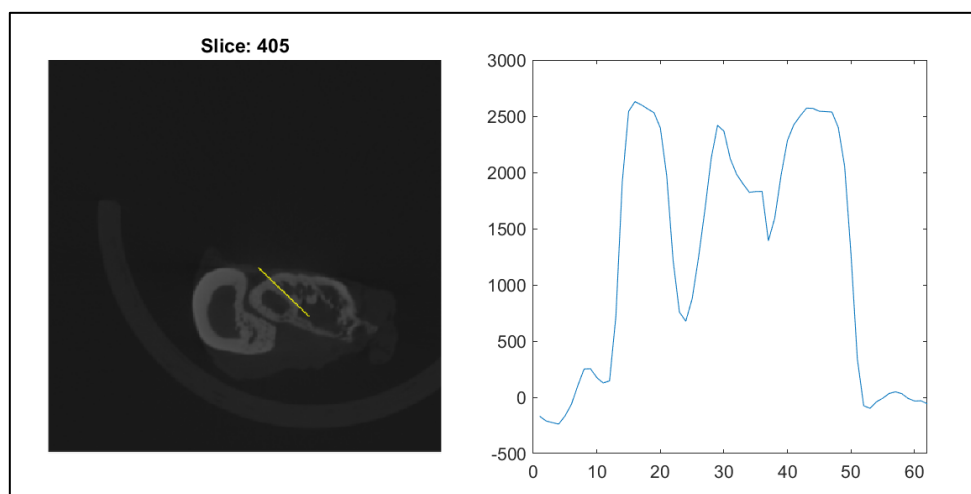
BV/TV

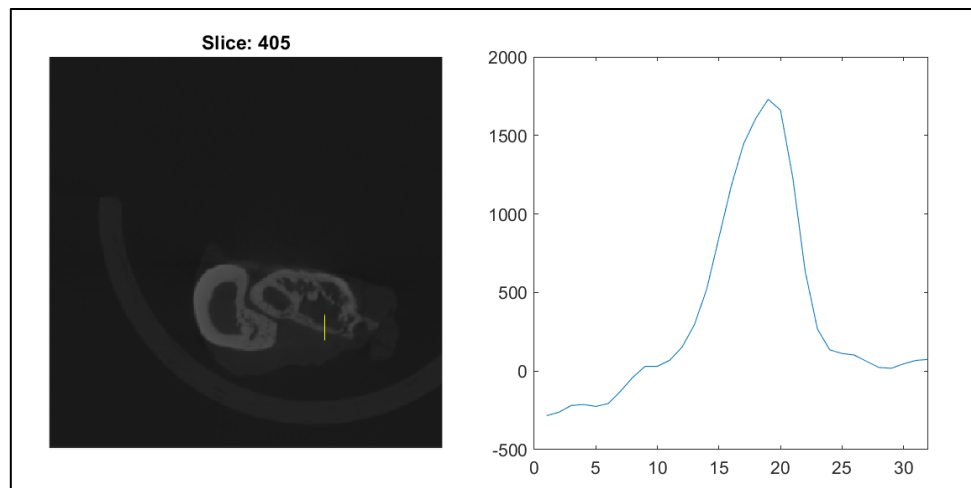


Estudio trabecular



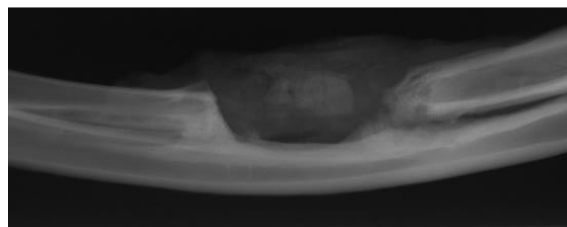
Estudio cortical



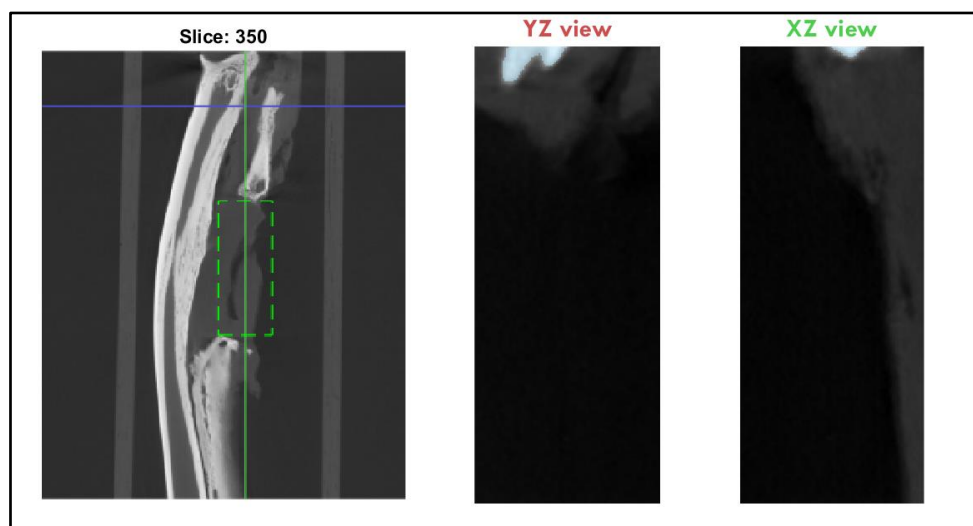


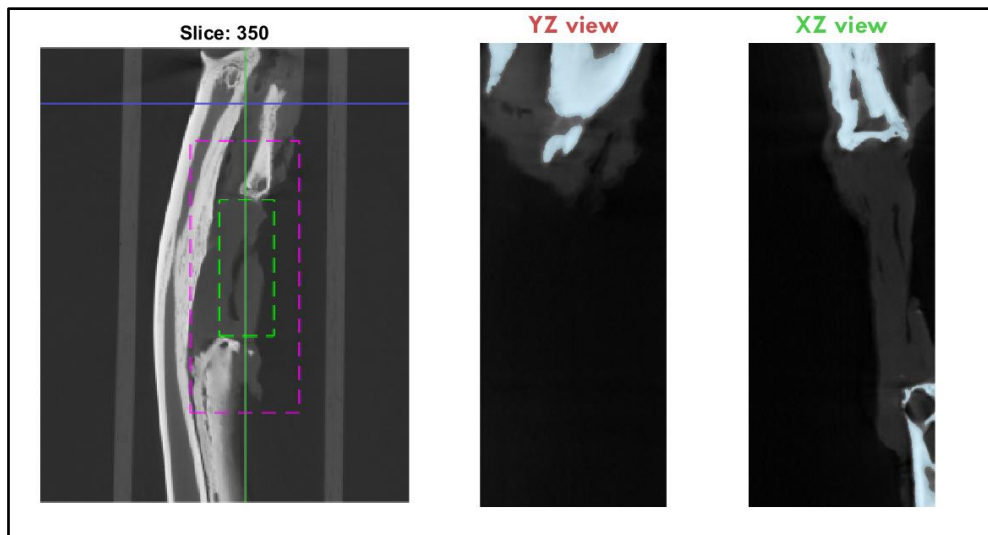
Pixel size (m	0,058															
id	Study name	ROI position	ROI size -X	Y BV(px)	TV(px)	BV/TV	Threshold	Radio	ROI trabecul	ROI cortical	sTb.N	Tb.Th(mm)	Tb.Sep(mm)	Cortical.Th(n		
0	CT_577277_i	610	134.348	16	634	1240	0,51129032	58,438776	3	186.4911	195.8277	29	0,05609147	0,55089139	0,48313402	
1	CT_577277_i	653	96.59649	126.6842	466.6667	466.6667					319.4912	375.9825	325.0175	391.3333		2,35062339
2	CT_577277_i	653	96.59649	126.6842	466.6667	466.6667					379.6667	415.2807	402.386	450.2807		1,74156772
3	CT_577277_i	405	45.01754	75.7193	466.6667	466.6667					293.7018	353.8772	324.4035	382.1228		2,2079813
4	CT_577277_i	405	45.01754	75.7193	466.6667	466.6667					371.0702	371.0702	384.5789	415.2807		0,52989664
5	CT_577277_i	350	309.4759	3	541903	1913695	0,28317104									
6	CT_577277_i	350	280.1517	2	3158575	9901170	0,31901028									

C15: 900046000192222

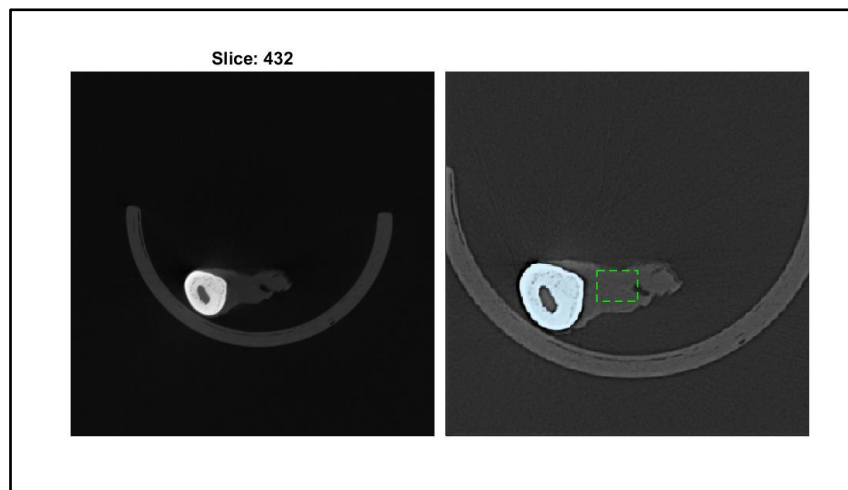


BV/TV

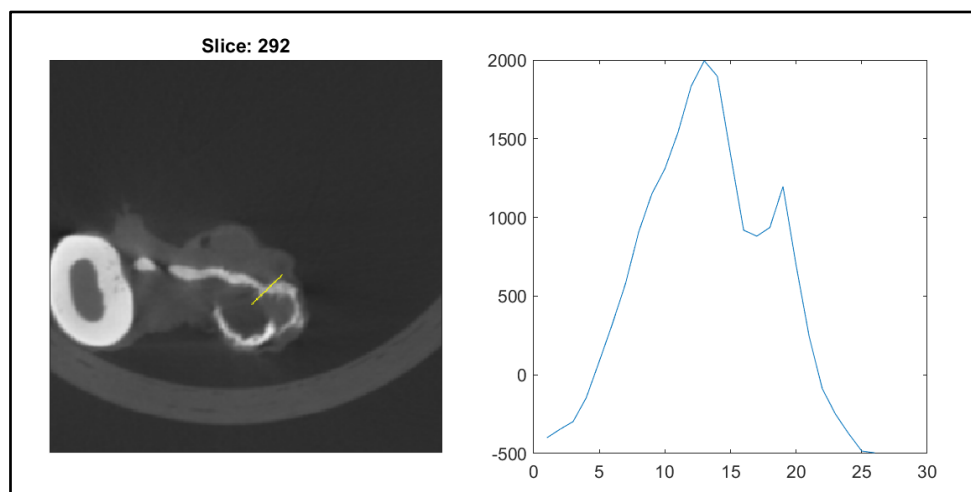


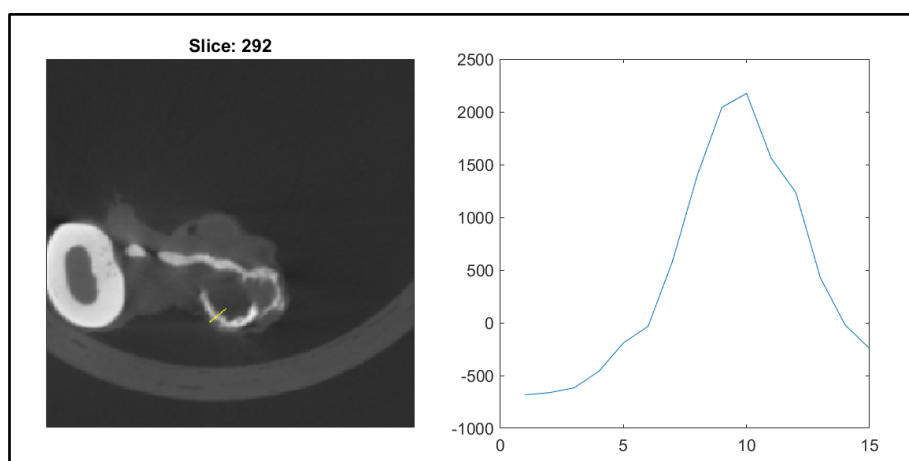
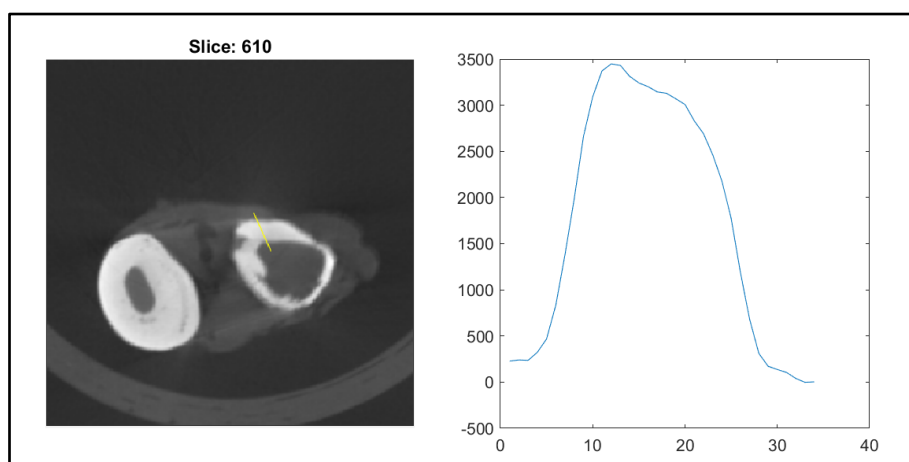
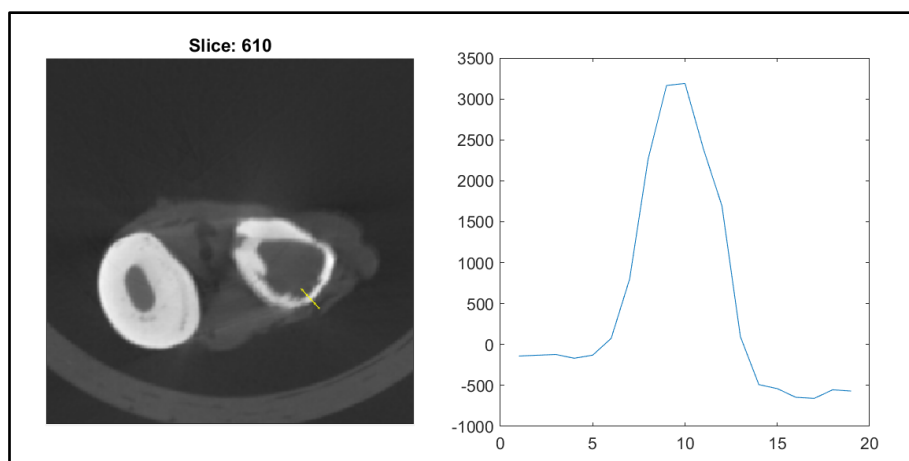


Estudio trabecular



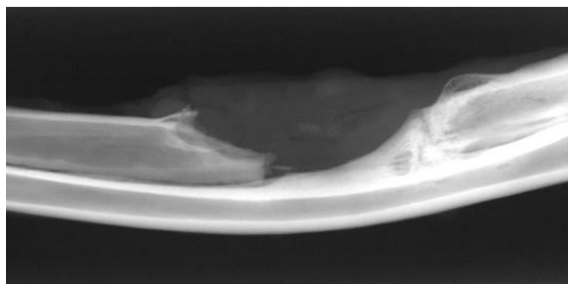
Estudio cortical



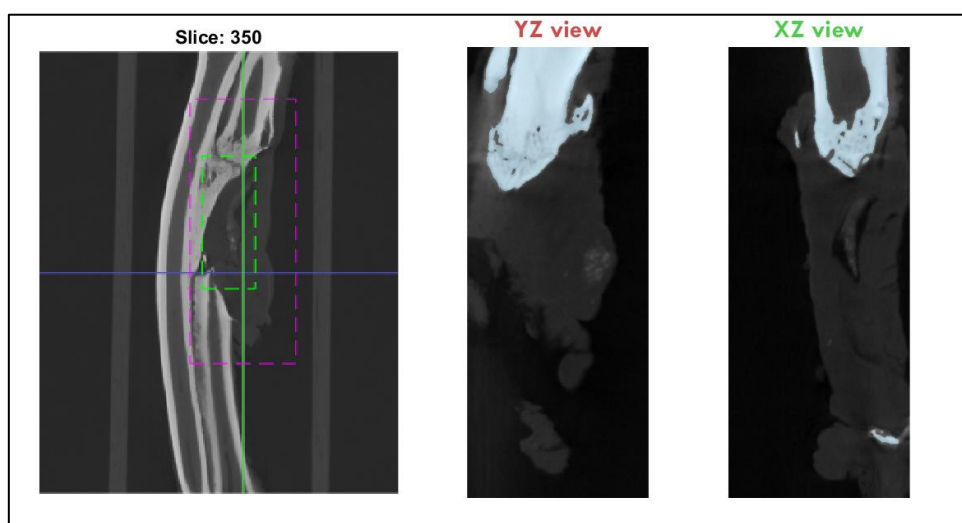
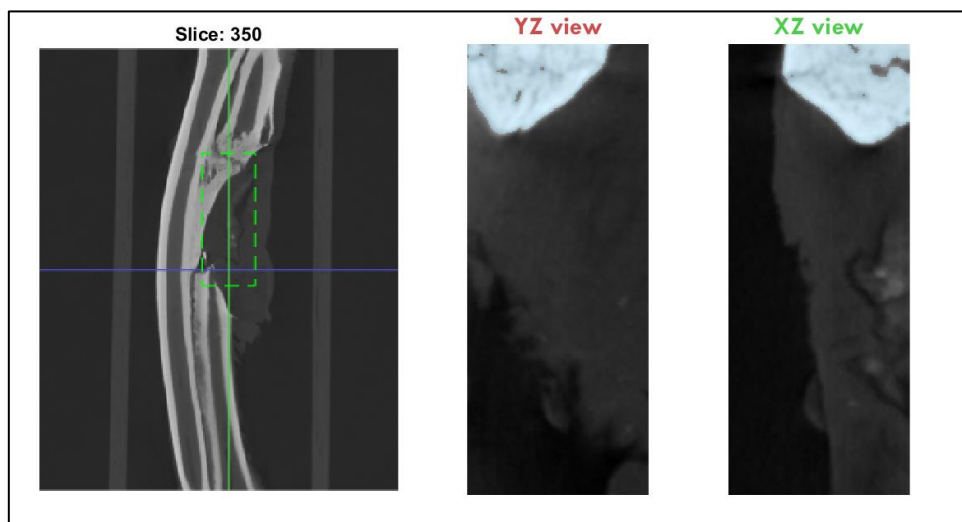


Pixel size (m	0,058														
id	Study name	ROI position	ROI size -X Y	BV(px)	TV(px)	BV/TV	Threshold	Radio	ROI trabecul	ROI cortical s Tb.N	Tb.Th(mm)	Tb.Sep(mm)	Cortical.Th(n		
0	CT_2222_id_	432	124.3717	1	0	1728	0	120	3	175.5172	229.7469	47	0	0	0
1	CT_2222_id_	610	208.1462	211.4211	311.1111	311.1111				383.7602	398.4971	342.0058	374.7544		1,19222118
2	CT_2222_id_	610	208.1462	211.4211	311.1111	311.1111				423.8772	439.4327	407.5029	424.6959		0,33433345
3	CT_2222_id_	292	218.9941	241.5088	311.1111	311.1111				403.614	379.0526	411.3918	435.1345		0,80845288
4	CT_2222_id_	292	218.9941	241.5088	311.1111	311.1111				370.8655	356.9474	452.3275	463.7895		0,30957679
5	CT_2222_id_	350	340.2759	3	8763	642809	0,01363235								
6	CT_2222_id_	350	285.7517	1	1368484	5839639	0,23434394								

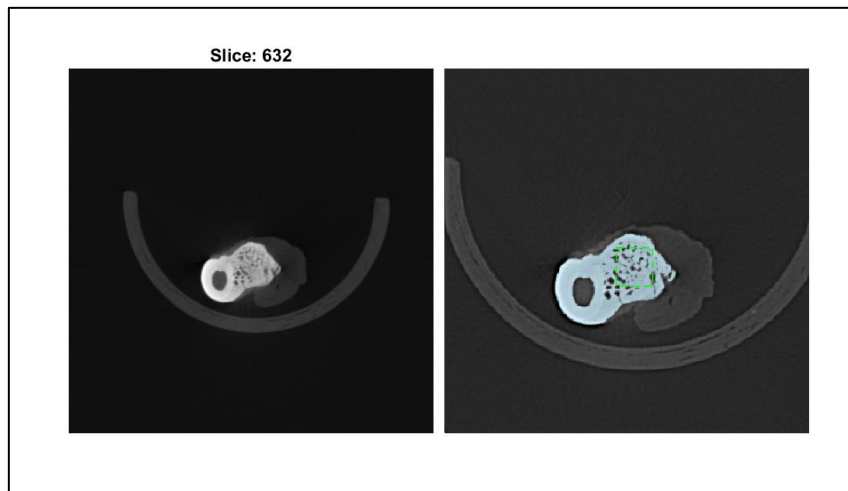
C24: H 61074



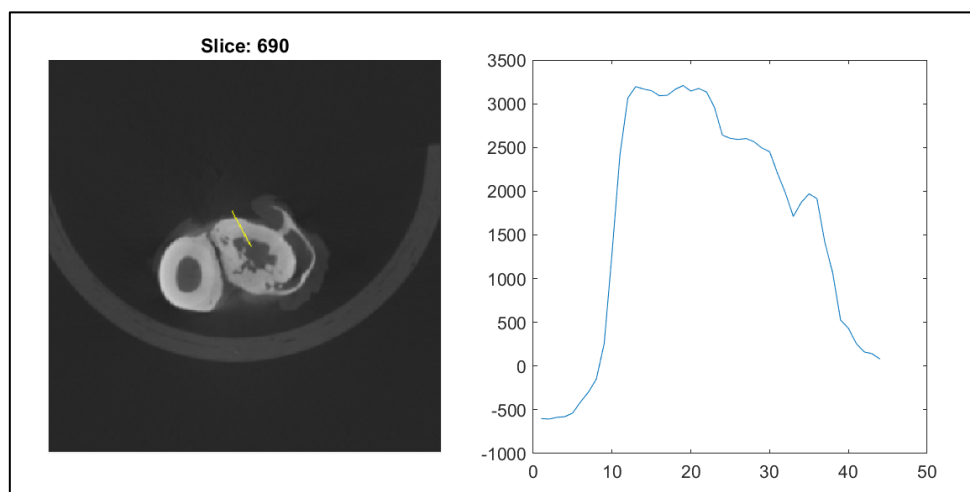
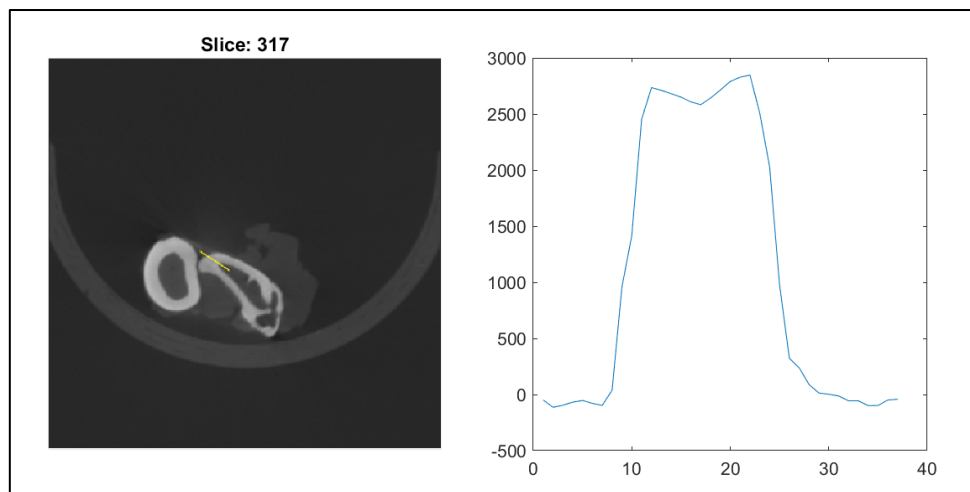
BV/TV

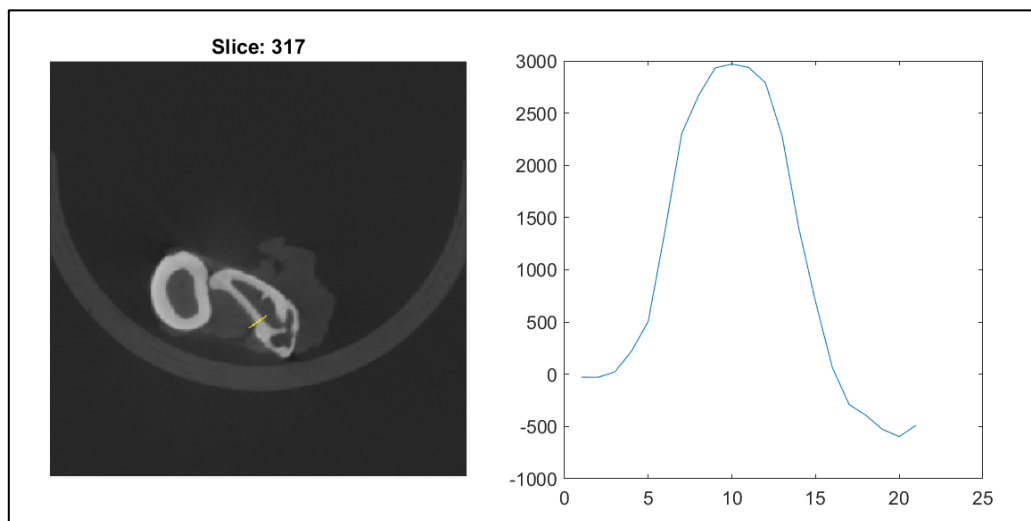
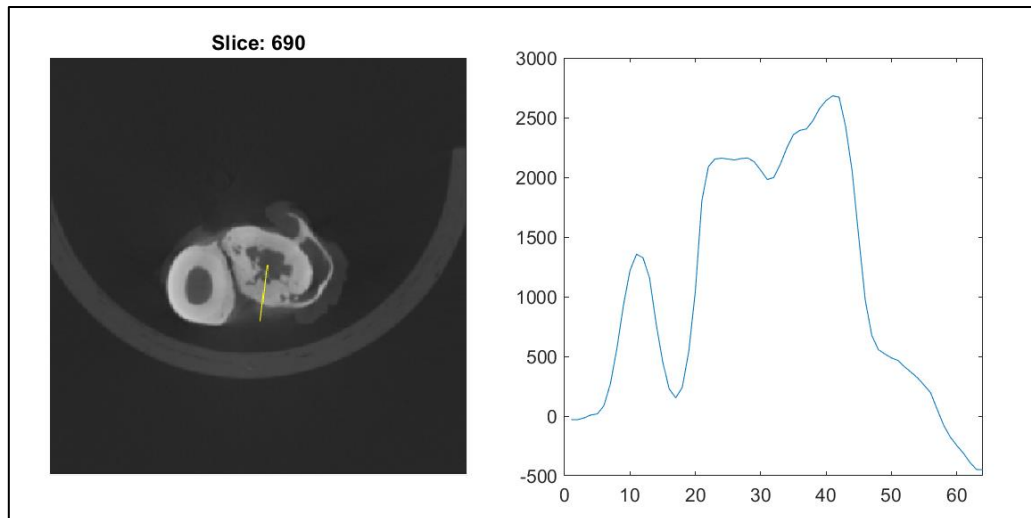


Estudio trabecular



Estudio cortical



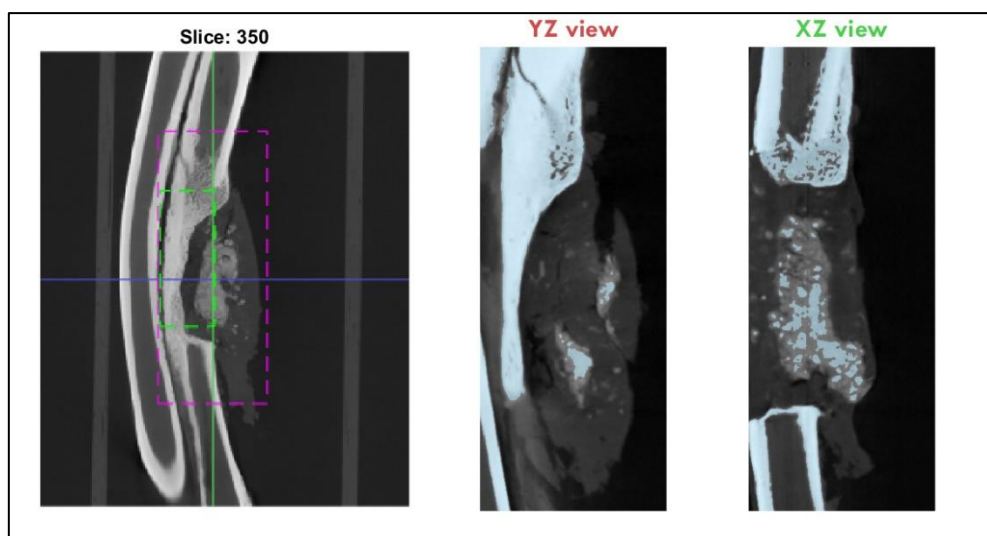
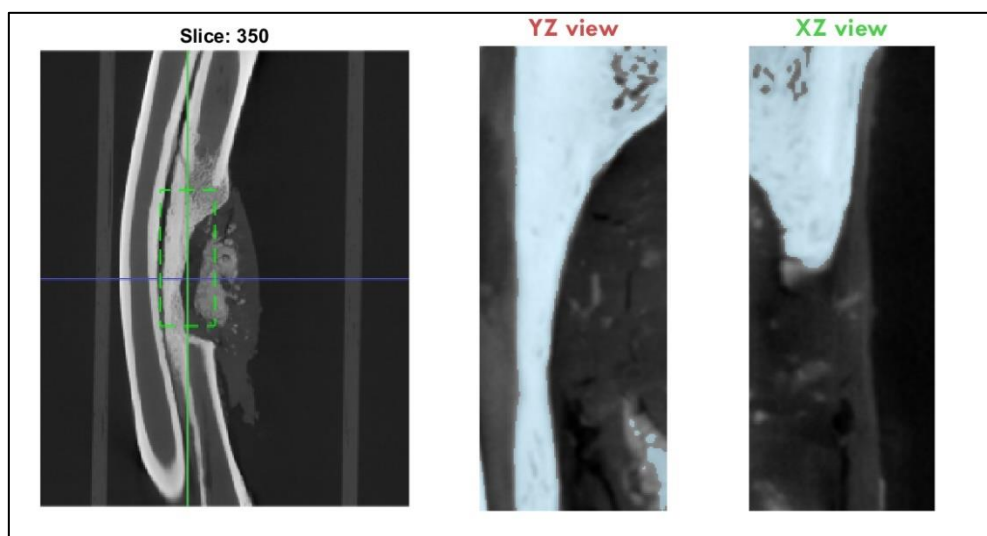


Pixel size (m)		0,058															
id	Study name	ROI position	ROI size - X Y	BV(px)	TV(px)	BV/TV	Threshold	Radio	ROI trabecul	ROI cortical	s Tb.N	Tb.Th(mm)	Tb.Sep(mm)	Cortical.Th(n)			
0	CT_61074_id	632	112.7328	1	1486	1935	0,76795866	113,315297	3	198.4626	206.8015	42	0,04019286	1,17662799	0,26641432		
1	CT_61074_id	690	138.3509	147.5614	466.6667	466.6667				382.1228	373.5263	380.2807	442.9123			2,34453214	
2	CT_61074_id	690	138.3509	147.5614	466.6667	466.6667				356.3333	379.6667	327.4737	370.4561			1,69578342	
3	CT_61074_id	317	119.9298	138.9649	466.6667	466.6667				299.8421	335.4561	370.4561	393.7895			0,98844997	
4	CT_61074_id	317	119.9298	138.9649	466.6667	466.6667				362.4737	342.8246	425.7193	439.2281			0,58042211	
5	CT_61074_id	350	317.8759	4	321311	1610225	0,19954416										
6	CT_61074_id	350	294.1517	2	2149914	8331639	0,25804215										

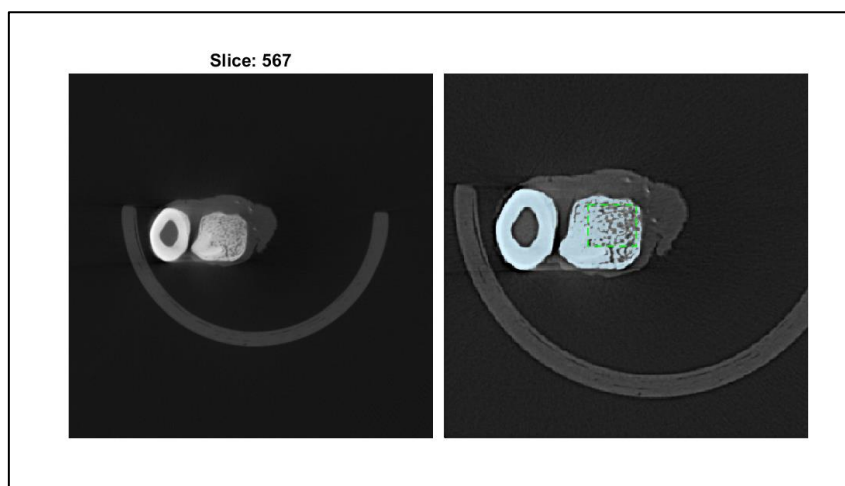
○ **Grupo B+C 6 semanas**

C12: H60945

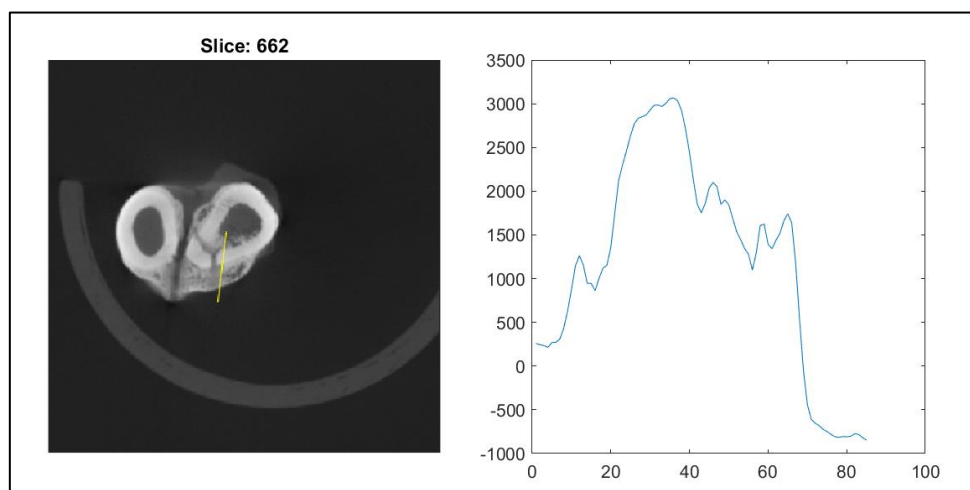
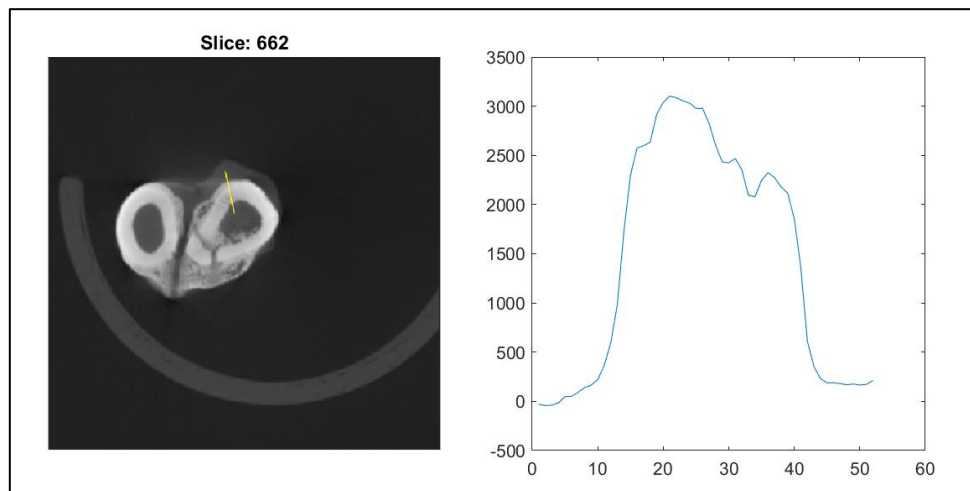
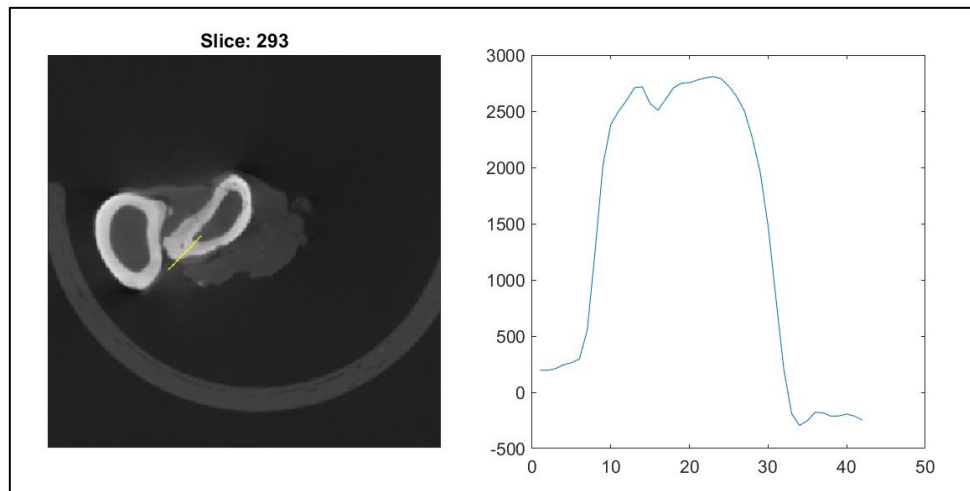
BV/TV

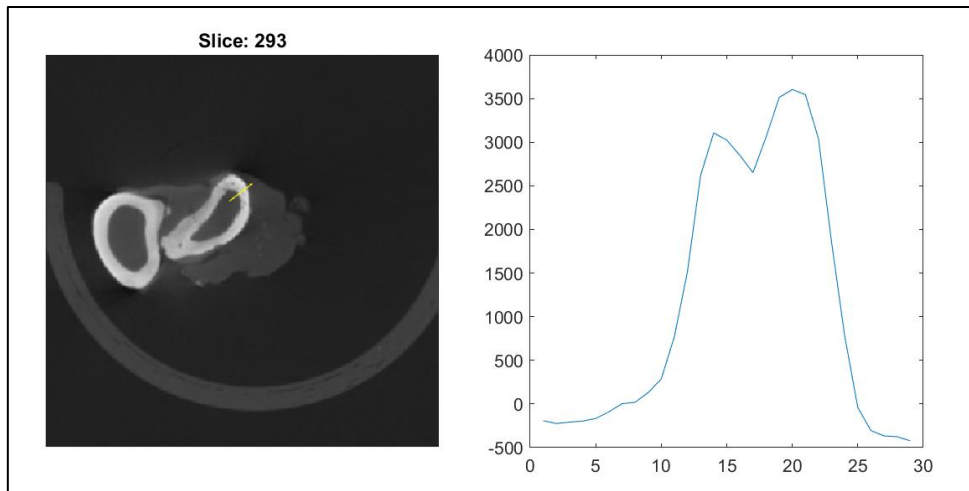


Estudio trabecular



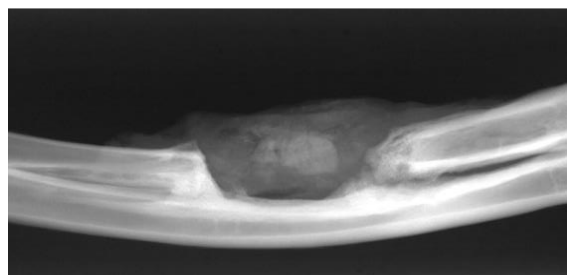
Estudio cortical



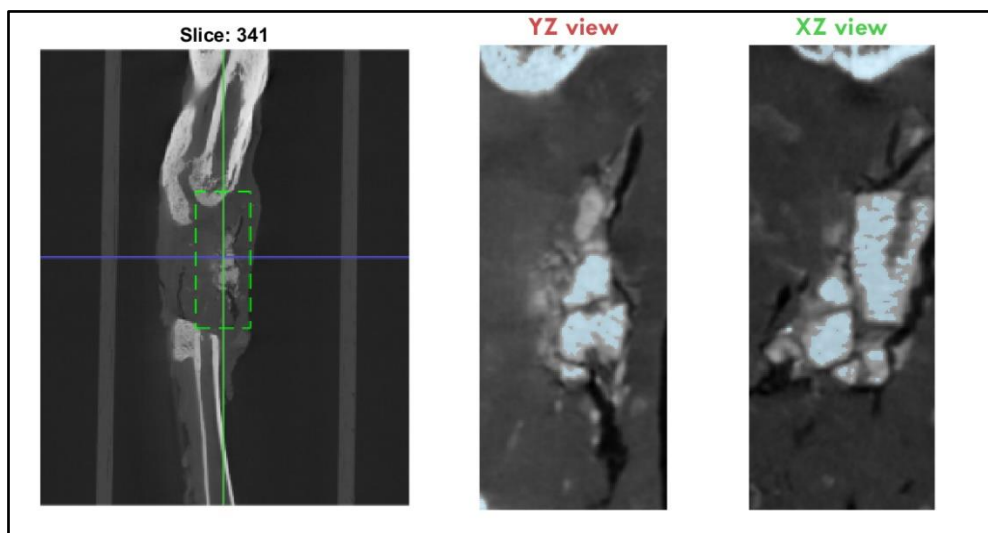


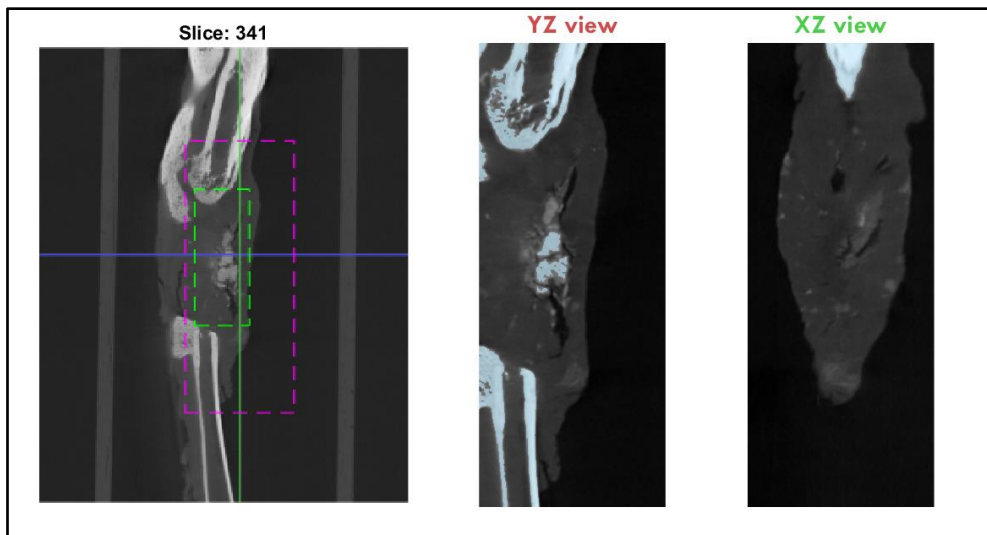
id	Study name	ROI position	ROI size -X Y	BV(px)	TV(px)	BV/TV	Threshold	Radio	ROI trabecul	ROI cortical	sTb.N	Tb.Th(mm)	Tb.Sep(mm)	Cortical.Th(n
0	CT_60945_id	567 89.45486	1	1371	2736	0,50109649	140	3	166.5386	151.9322	55	0,05660494	0,51551378	0,50913183
1	CT_60945_id	662 91.07018	110.1053	466.6667	466.6667					302.9123	293.0877	314.5789	398.0877	3,35237361
2	CT_60945_id	662 91.07018	110.1053	466.6667	466.6667					301.6842	312.7368	245.807	296.1579	1,6971701
3	CT_60945_id	293 105.193	102.7368	466.6667	466.6667					287.5614	248.2632	318.2632	358.7895	1,38896581
4	CT_60945_id	293 105.193	102.7368	466.6667	466.6667					323.1754	350.193	277.7368	256.8597	0,7638682
5	CT_60945_id	350 228.2759	3	704644	1956099	0,36022921								
6	CT_60945_id	350 224.1517	1	2853081	10149048	0,28111809								

C17: 900046000192221

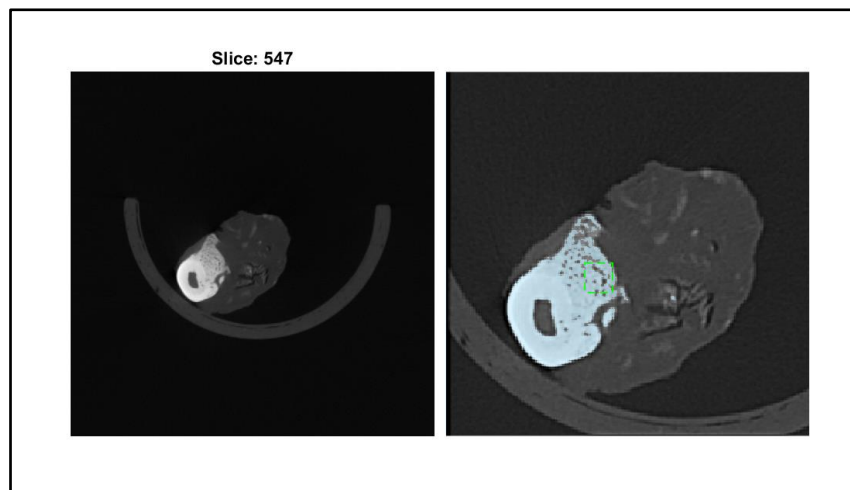


BV/TV

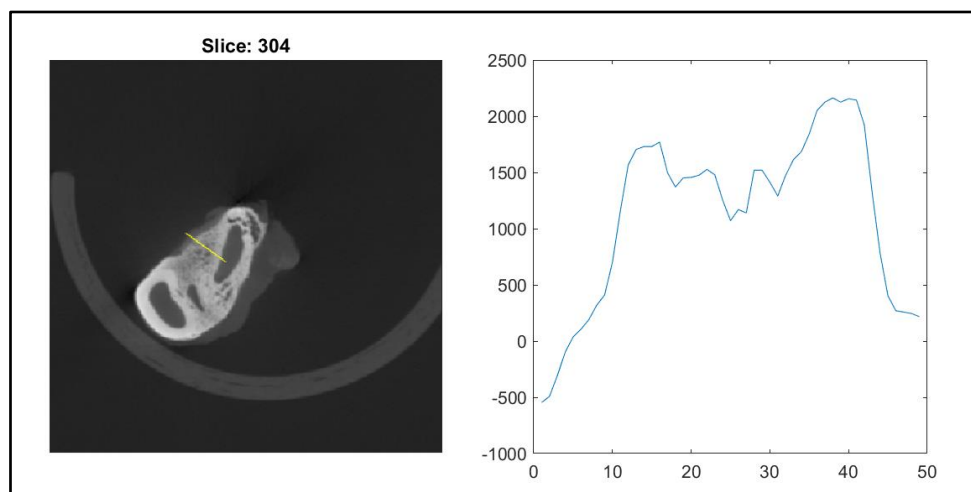


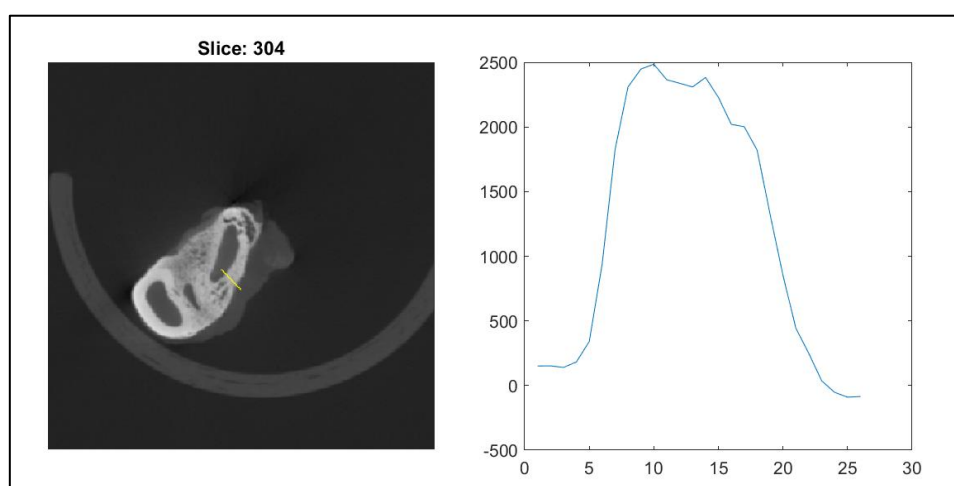
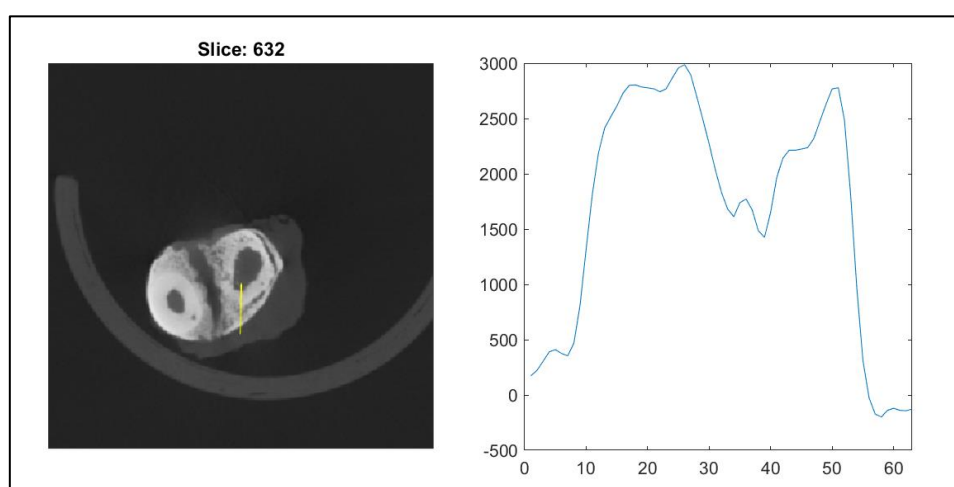
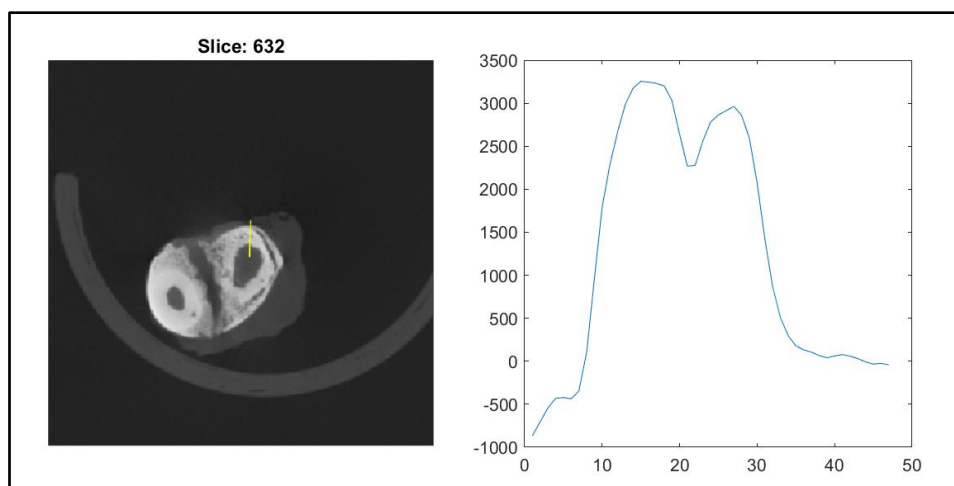


Estudio trabecular



Estudio cortical

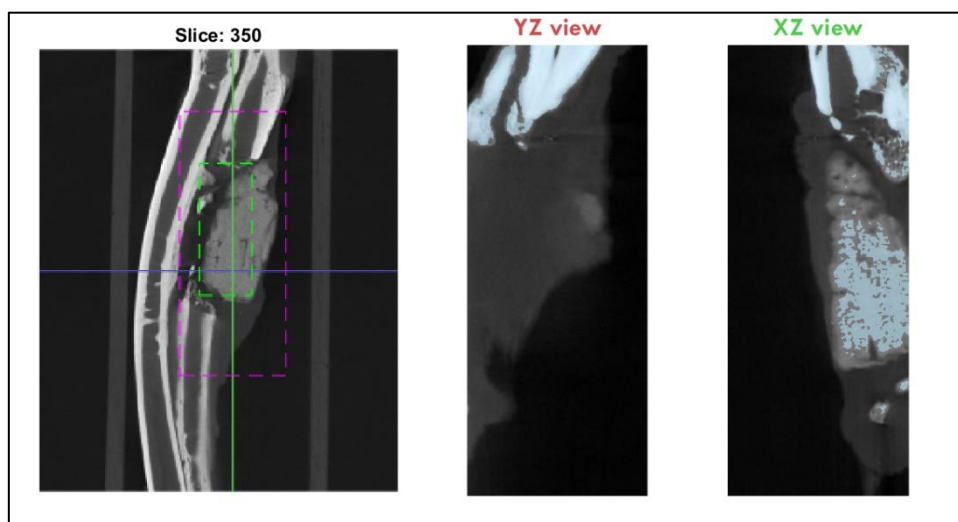
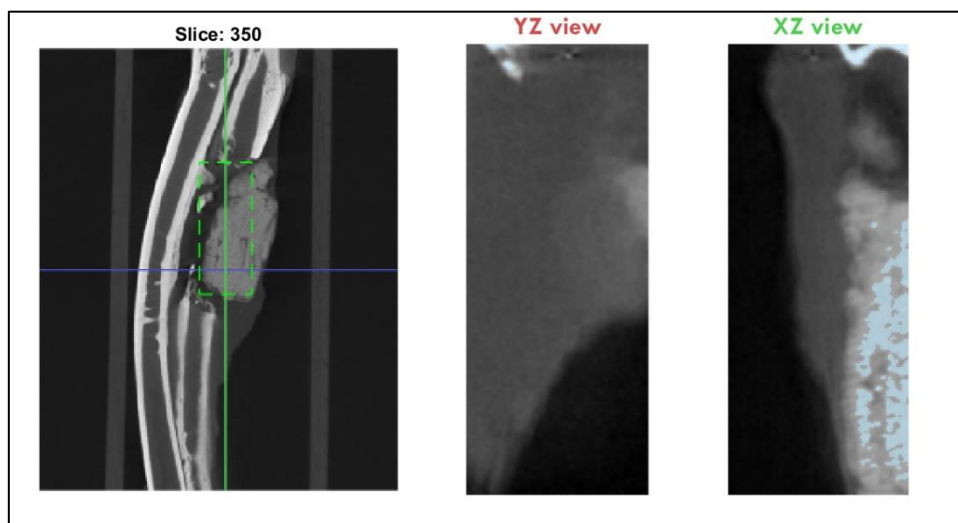




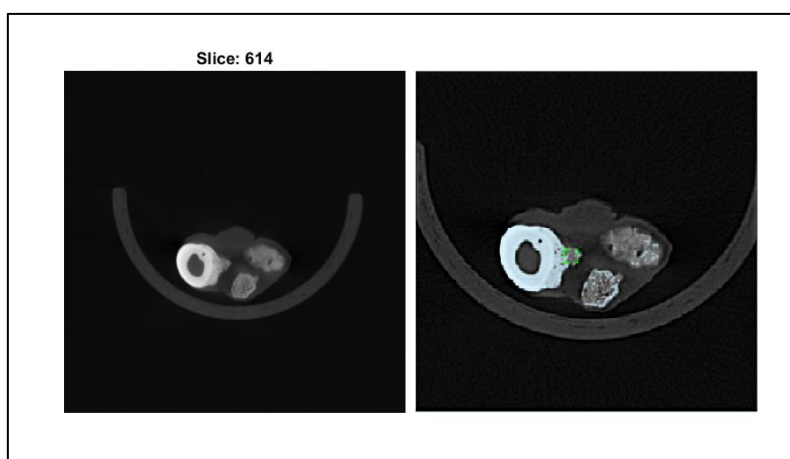
Pixel size (m		0,058													
id	Study name	ROI position	ROI size -X	Y	BV(px)	TV(px)	BV/TV	Threshold	Radio	ROI trabecul	ROI cortical	Tb.N	Tb.Th(mm)	Tb.Sep(mm)	Cortical.Th(n)
0	CT_2221_id	547	152.2683	1	912	1155	0,78961039	135,582458	3	162.0172	220.8966	31	0,03426559	1,38290196	0,30975824
1	CT_2221_id	632	97.21053	105.807	466.6667	466.6667					331.1579	329.9298	372.9123	434.3158	2,6433726
2	CT_2221_id	632	97.21053	105.807	466.6667	466.6667					342.2105	340.9825	299.2281	344.6667	1,38431184
3	CT_2221_id	304	97.82456	111.9474	466.6667	466.6667					259.3158	307.2105	317.6491	352.0351	2,01801403
4	CT_2221_id	304	97.82456	111.9474	466.6667	466.6667					307.2105	330.5439	361.8596	386.4211	0,8763129
5	CT_2221_id	341	295.4759	3	129919	2646880	0,04908383								
6	CT_2221_id	341	277.3517	1	1360099	8304543	0,16377771								

C25: H31088

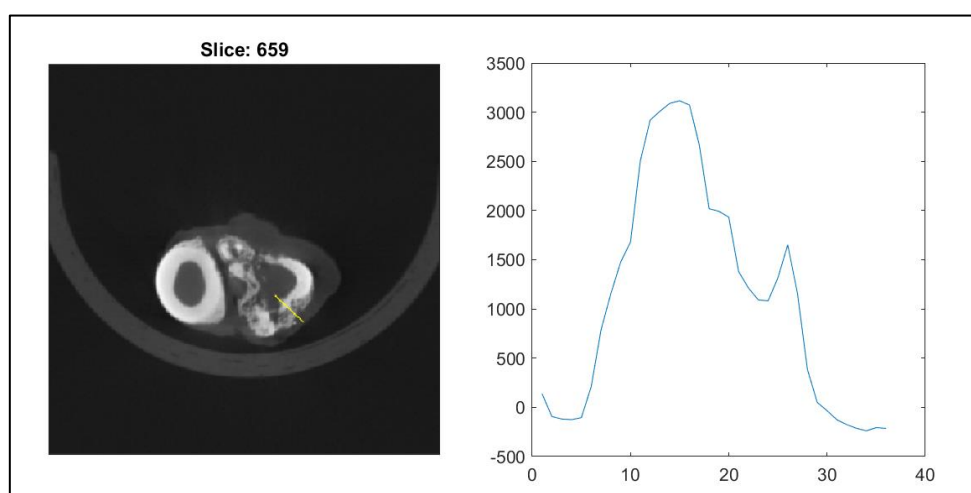
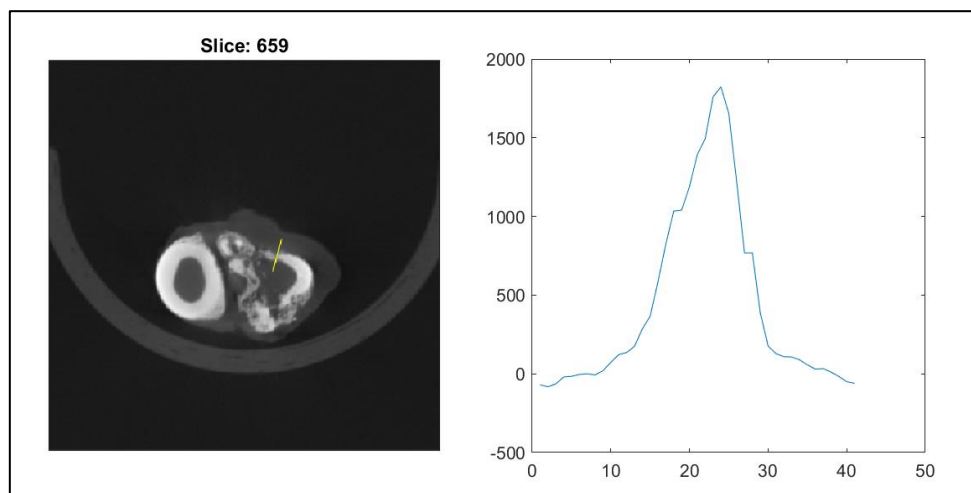
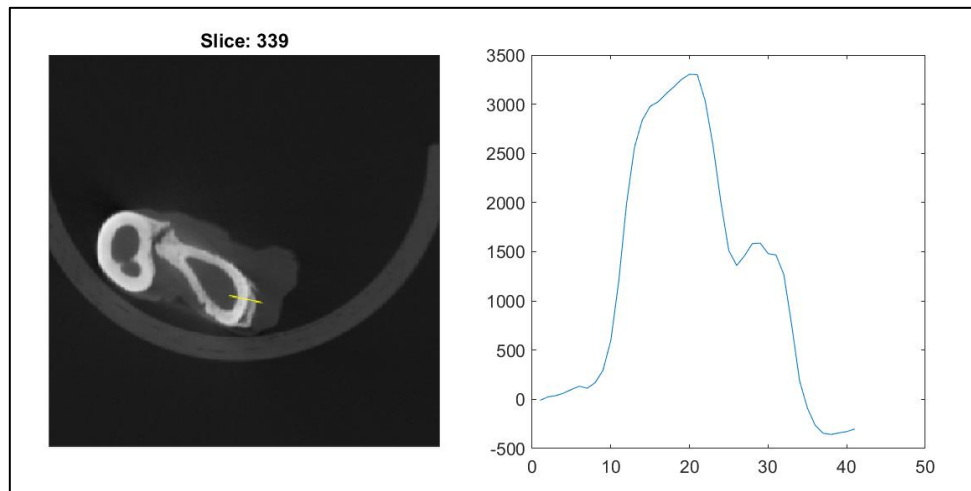
BV/TV

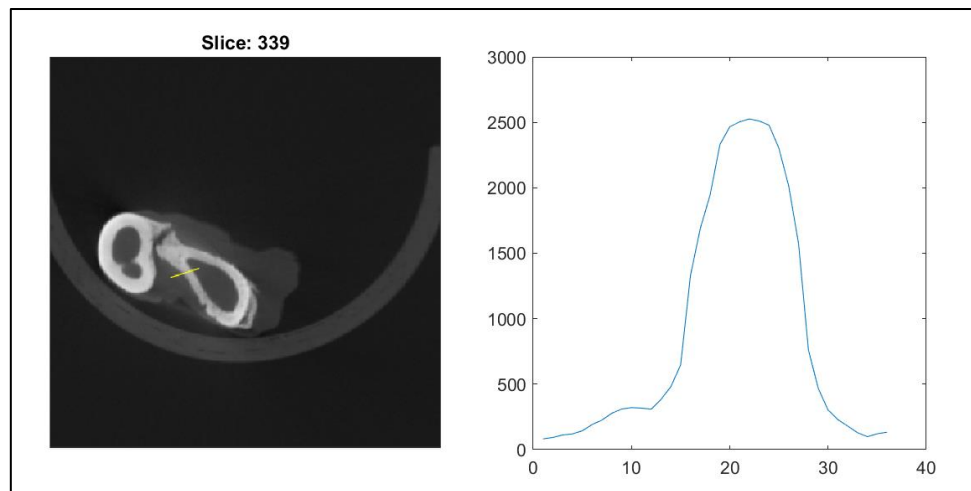


Estudio trabecular



Estudio cortical



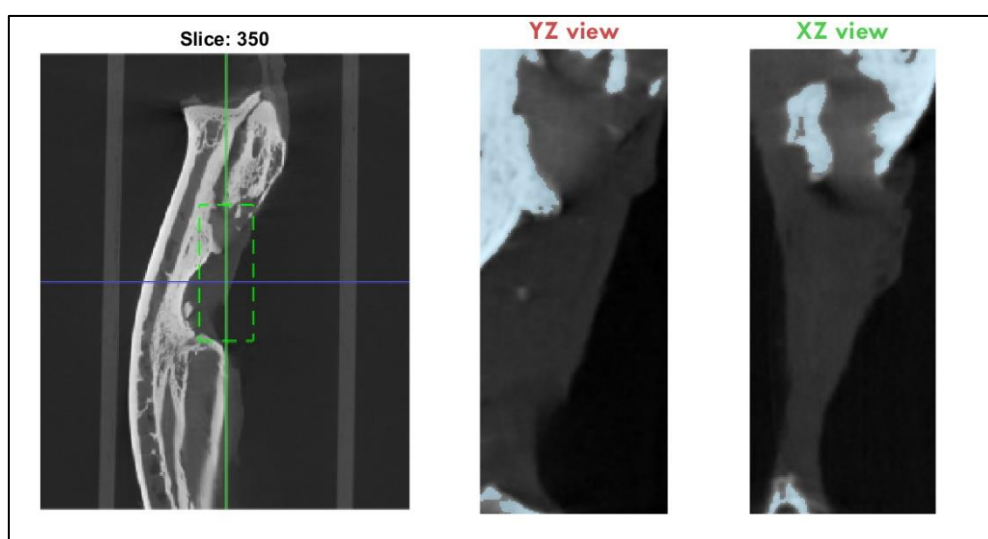


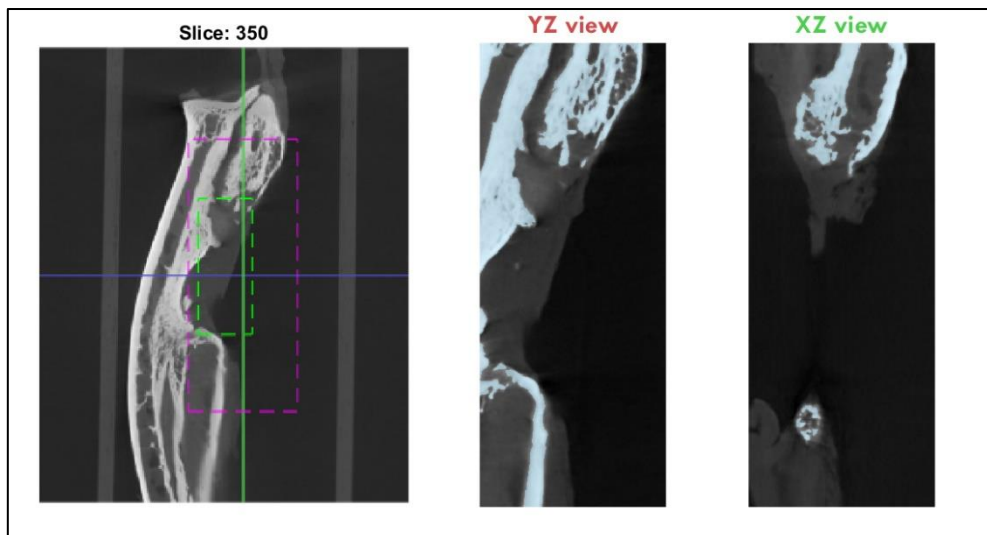
Pixel size (m		0,058														
id	Study name	ROI position	ROI size -X Y	BV(px)	TV(px)	BV/TV	Threshold	Radio	ROI trabecul	ROI cortical	Tb.N	Tb.Th(mm)	Tb.Sep(mm)	Cortical.Th(n		
0	CT_31088_id	614	0.5 0.5	71	306	0,23202614	135,208788	3	183.0172	219.8966	16	0,03878158	0,284	1,21155556		
1	CT_31088_id	659	118.0877	134.6667	466.6667	466.6667				387.6491	422.0351	411.5965	443.5263	1,19687876		
2	CT_31088_id	659	118.0877	134.6667	466.6667	466.6667				396.2456	385.193	348.9649	388.2632	0,81431702		
3	CT_31088_id	339	126.0702	147.5614	466.6667	466.6667				341.5965	380.8947	434.3158	442.9123	1,33368321		
4	CT_31088_id	339	126.0702	147.5614	466.6667	466.6667				270.3684	304.7544	410.9825	399.9298	0,79606139		
5	CT_31088_id	350	312.2759	3	211083	1685911	0,12520412									
6	CT_31088_id	350	274.5517	2	2154977	8814931	0,24446896									

○ **Grupo B+C 12 semanas**

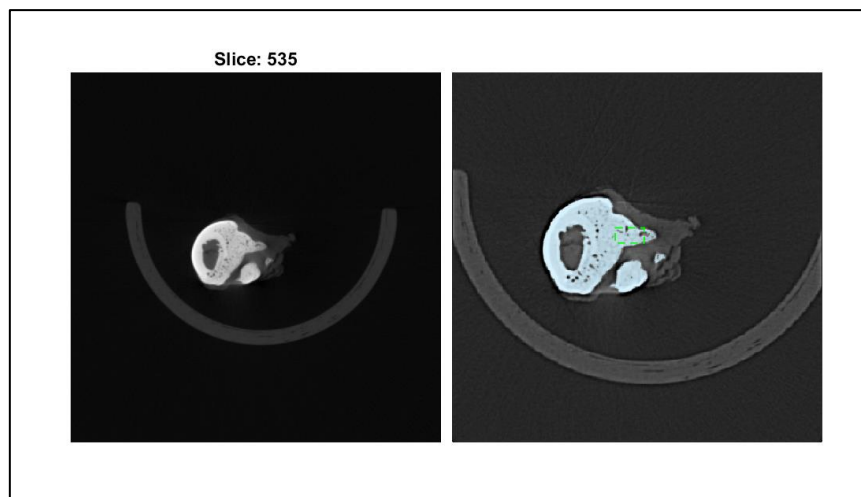
C2: H577639

BV/TV

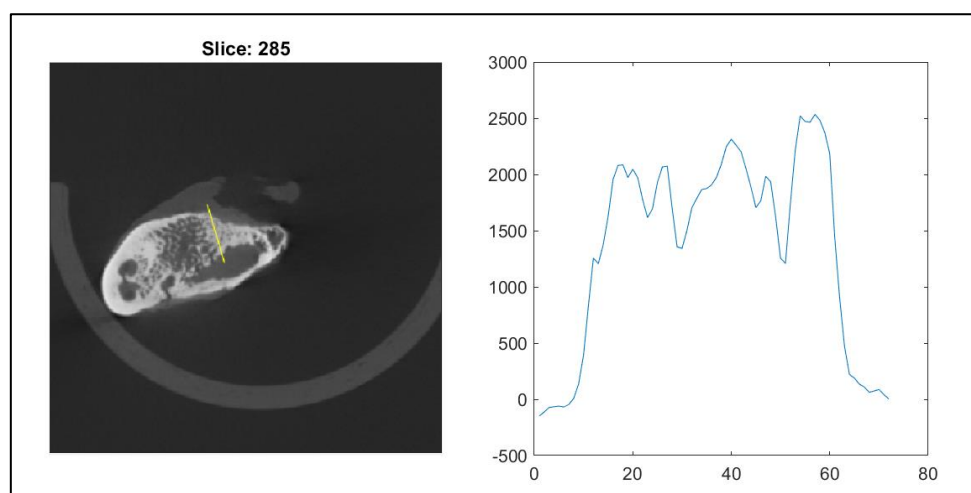


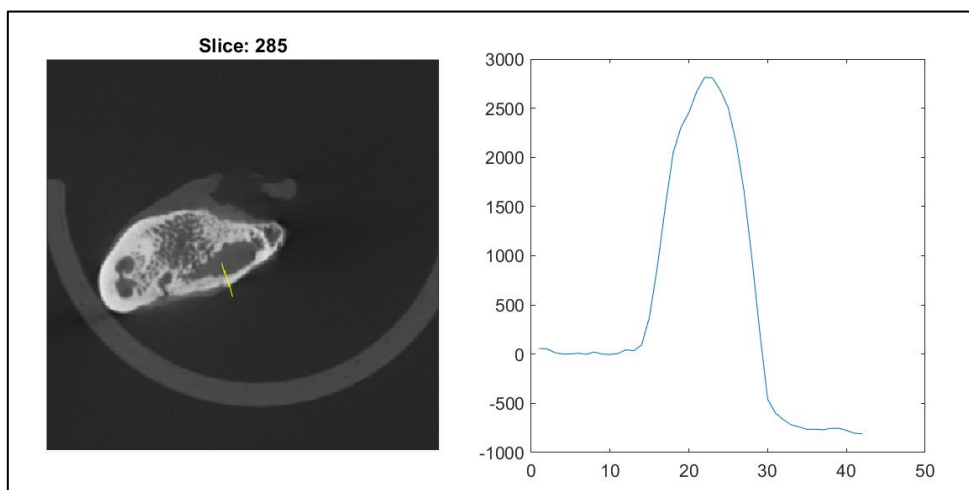
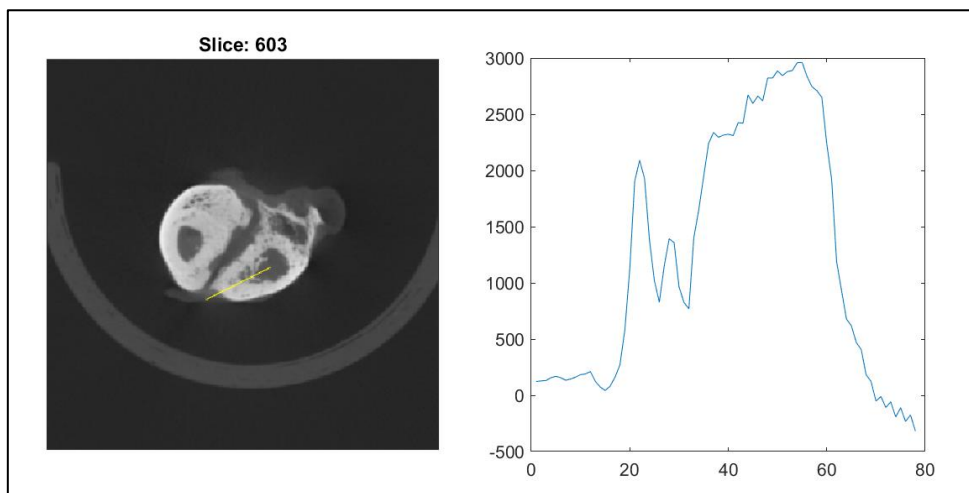
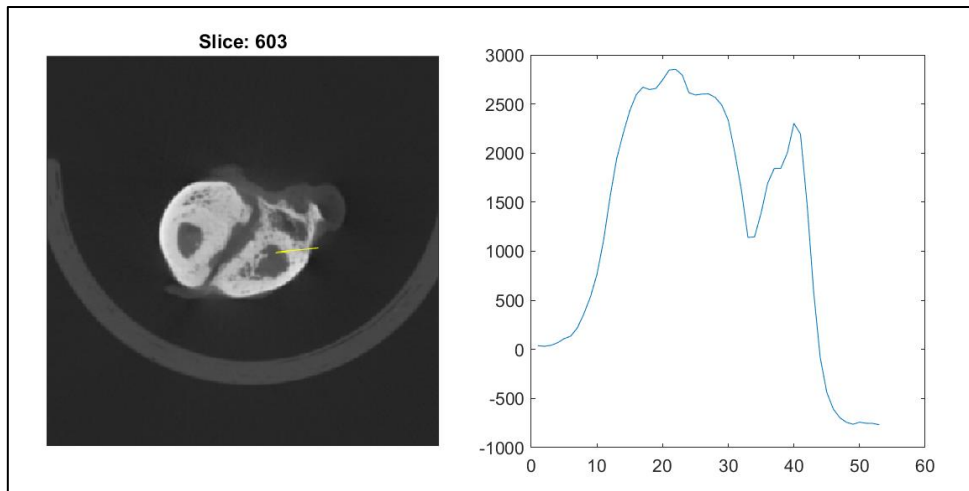


Estudio trabecular

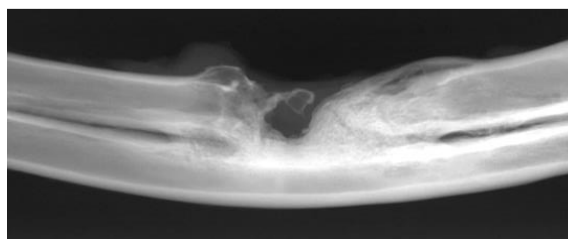


Estudio cortical

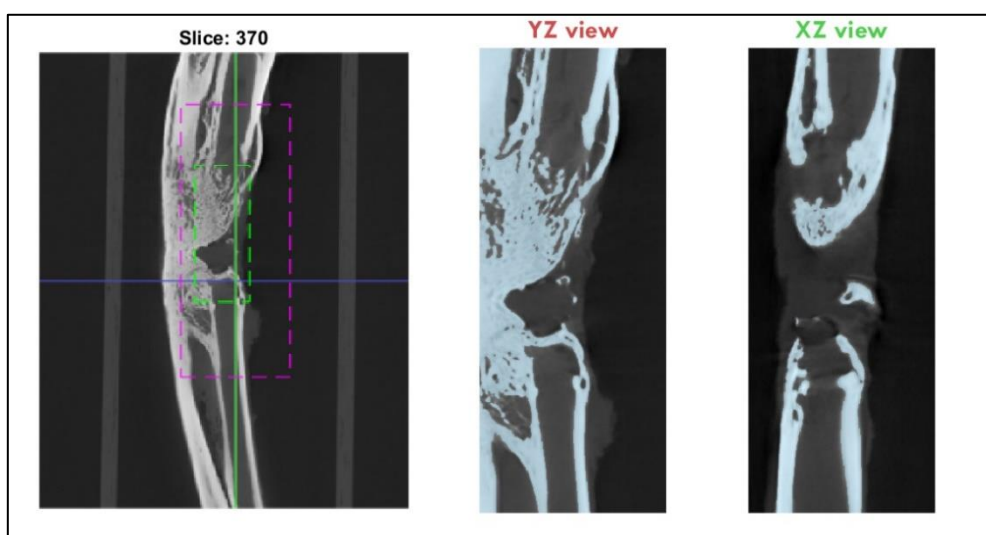
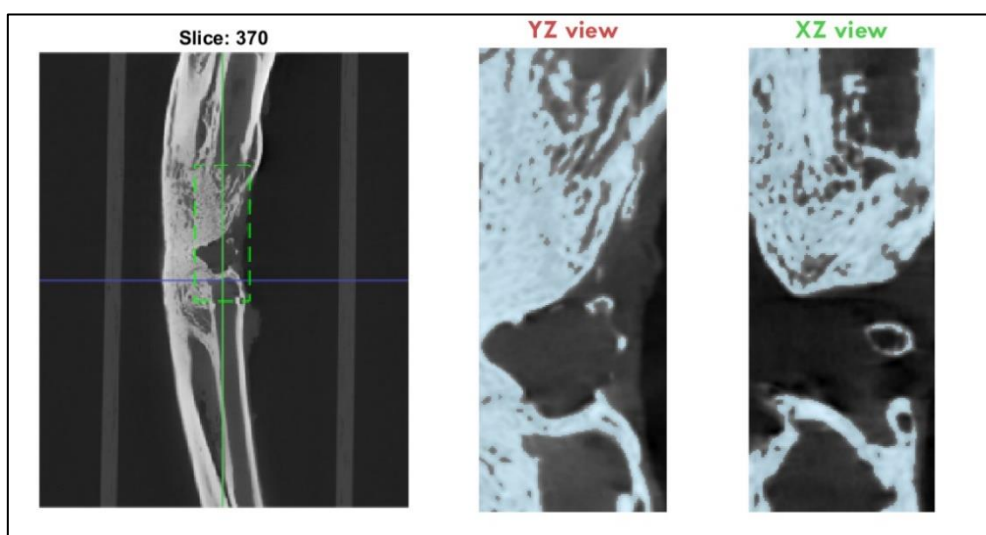




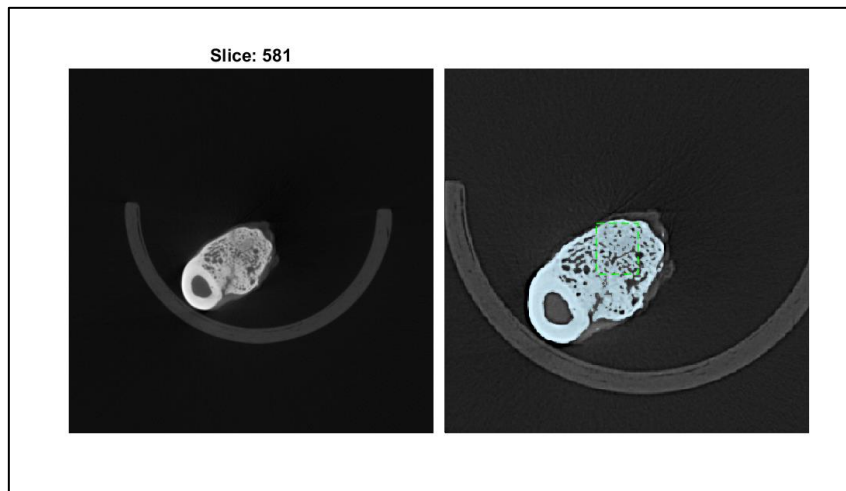
Pixel size (m		0,058													
id	Study name	ROI position	ROI size - X	Y	BV(px)	TV(px)	BV/TV	Threshold	Radio	ROI trabecul	ROI cortical s	Tb.N	Tb.Th(mm)	Tb.Sep(mm)	Cortical.Th(n
0	CT_577639_i	535	113.8412	1	544	646	0,84210526	140	3	186.0172	177.3966	32	0,02393479	2,10346667	0,31978378
1	CT_577639_i	603	118.0877	121.7719	466.6667	466.6667					383.9649	307.8246	371.6842	409.7544	2,59560097
2	CT_577639_i	603	118.0877	121.7719	466.6667	466.6667					390.1053	441.6842	358.1754	352.0351	1,95451828
3	CT_577639_i	285	105.807	103.3509	466.6667	466.6667					293.0877	313.9649	273.4386	343.4386	3,05389726
4	CT_577639_i	285	105.807	103.3509	466.6667	466.6667					313.9649	327.4737	347.1228	387.6491	0,75606944
5	CT_577639_i	350	301.0759	3	365426	1443435	0,25316415								
6	CT_577639_i	350	282.9517	1	2409217	6724868	0,35825491								

C13: H61208

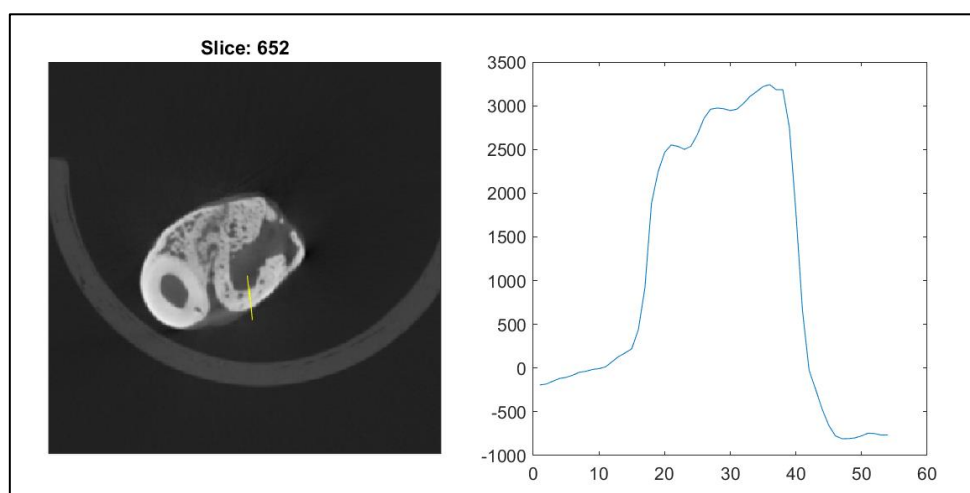
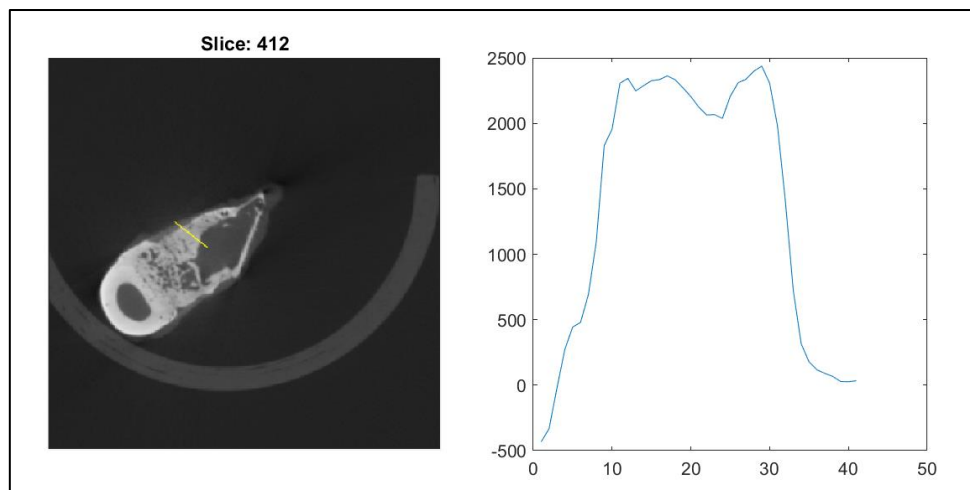
BV/TV

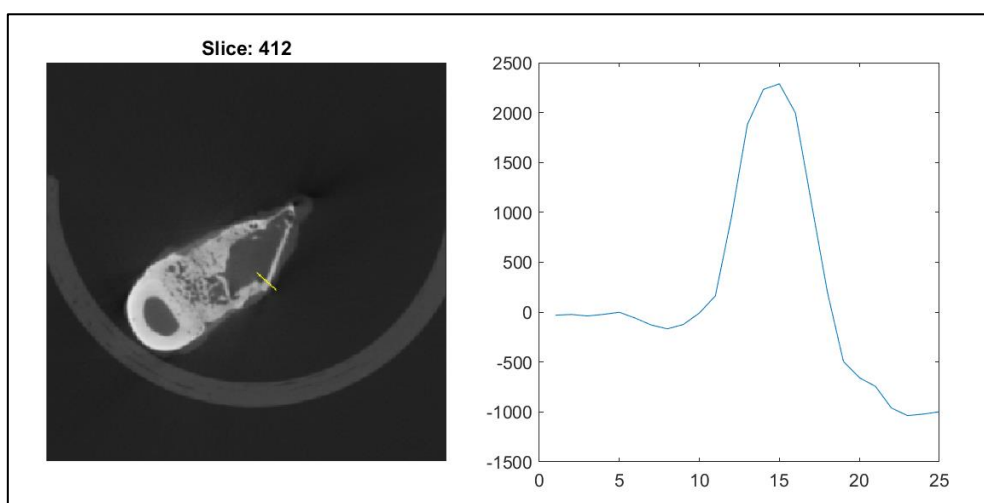
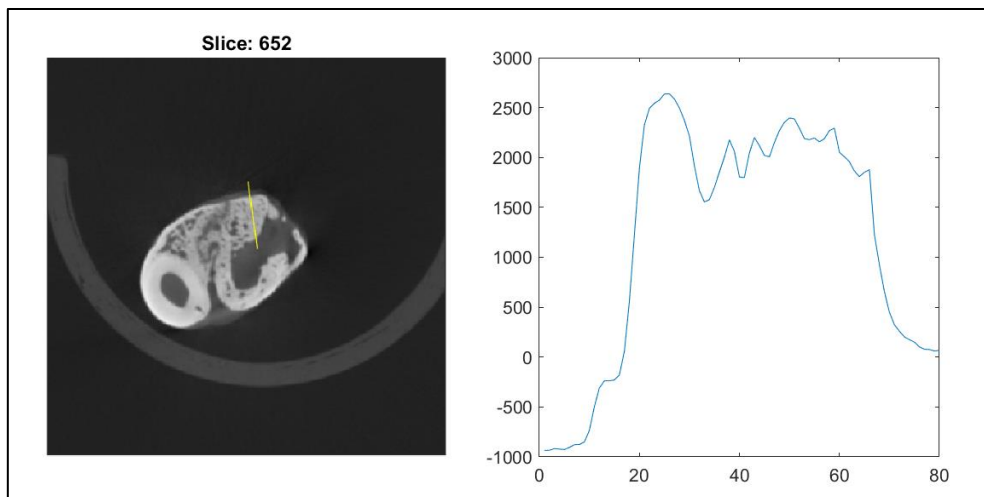


Estudio trabecular



Estudio cortical

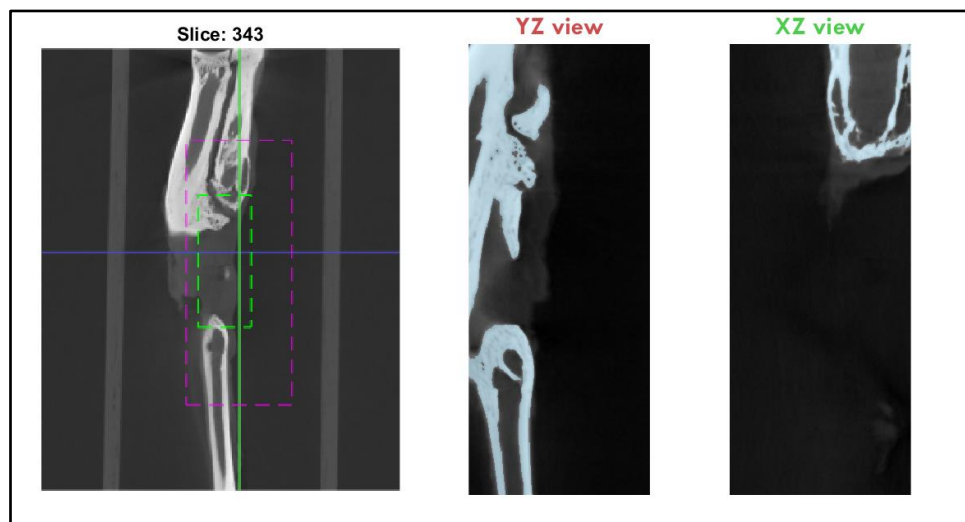
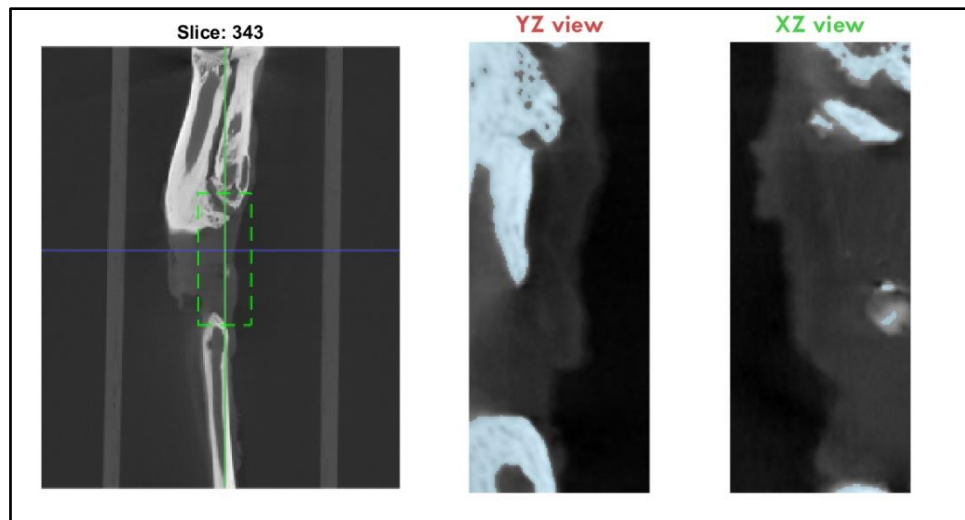




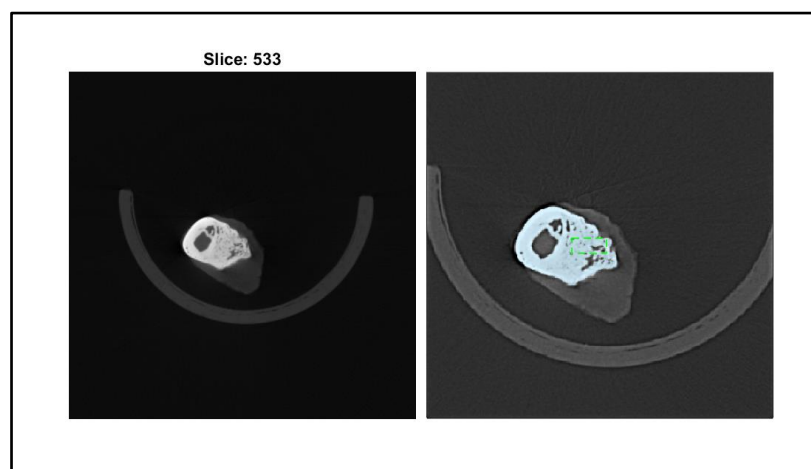
Pixel size (m		0,058													
id	Study name	ROI position	ROI size -X Y	BV(px)	TV(px)	BV/TV	Threshold	Radio	ROI trabecul	ROI cortical	s Tb.N	Tb.Th(mm)	Tb.Sep(mm)	Cortical.Th(n	
0	CT_61208_id	581	110.5158	1	2200	2891	0,76098236	110,09376	3	175.5172	178.868	48	0,04260334	1,09059829	0,2707973
1	CT_61208_id	652	113.1754	140.807	466.6667	466.6667					348.3509	359.4035	287.5614	366.1579	2,9770193
2	CT_61208_id	652	113.1754	140.807	466.6667	466.6667					349.5789	355.7193	395.6316	448.4386	1,42313273
3	CT_61208_id	412	151.2456	131.5965	466.6667	466.6667					301.6842	340.9825	327.4737	358.1754	1,58639386
4	CT_61208_id	412	119.3158	125.4561	466.6667	466.6667					364.3158	387.6491	371.6842	392.5614	0,34945422
5	CT_61208_id	370	295.4759	3	1108615	2456296	0,45133608								
6	CT_61208_id	370	268.9517	2	3963858	8749280	0,45304962								

C19: 900046000192223

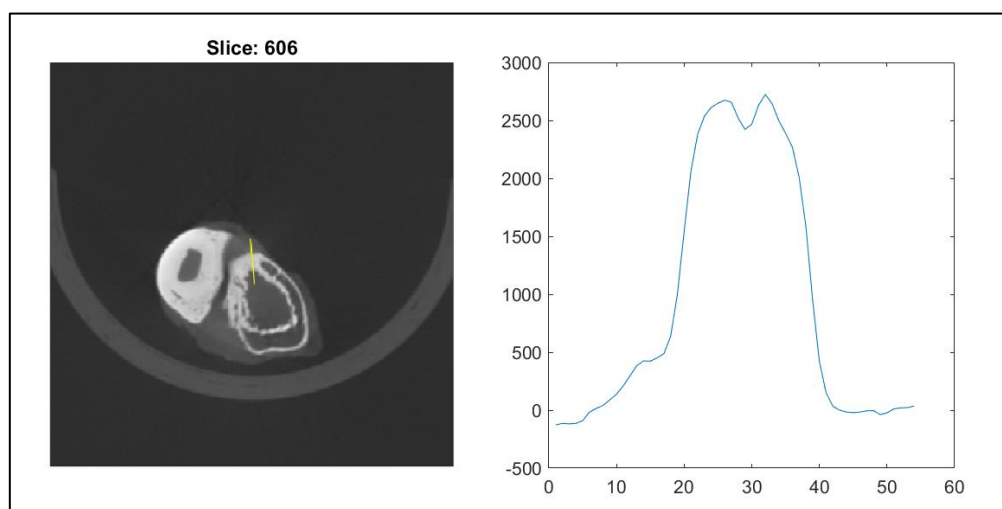
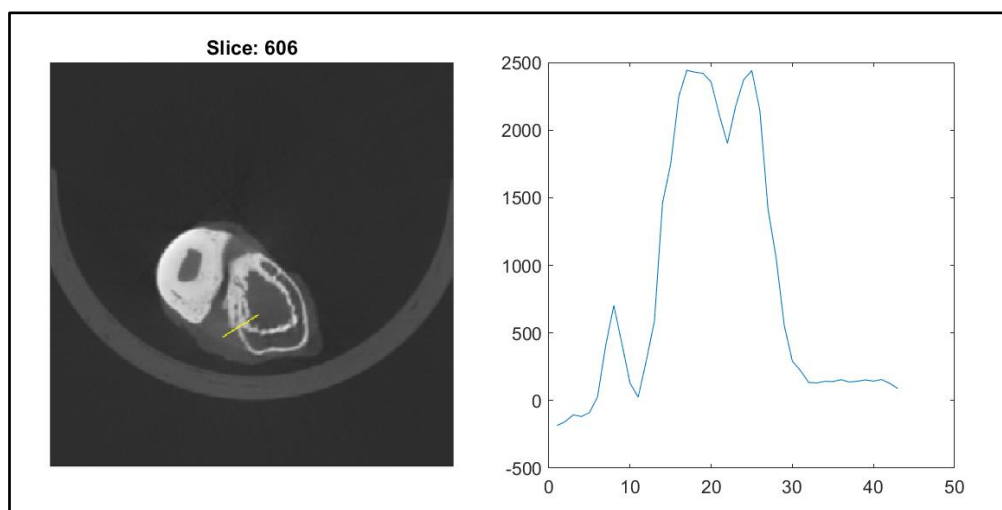
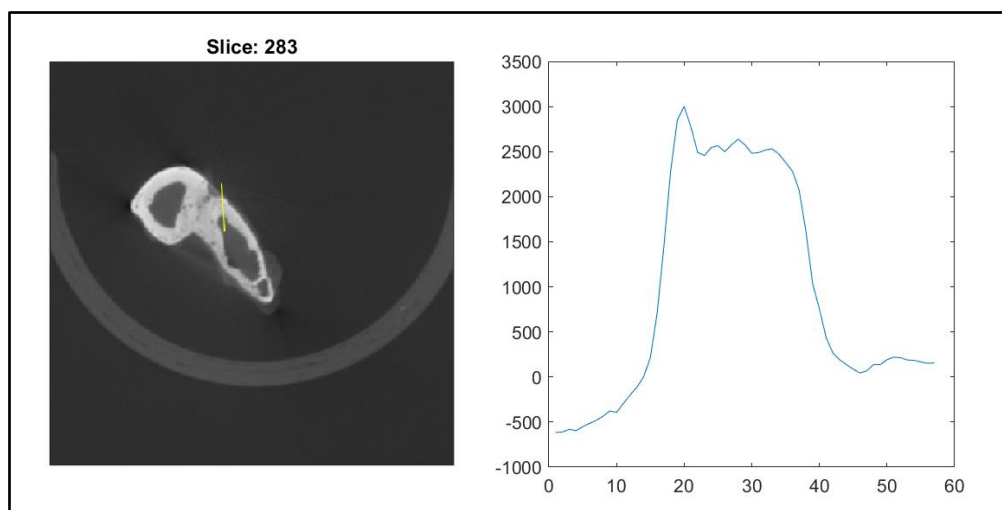
BV/TV

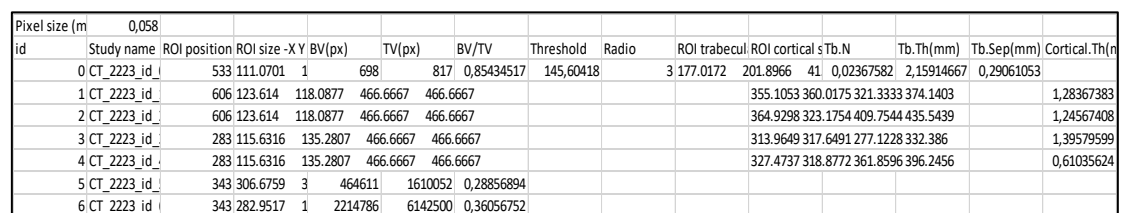


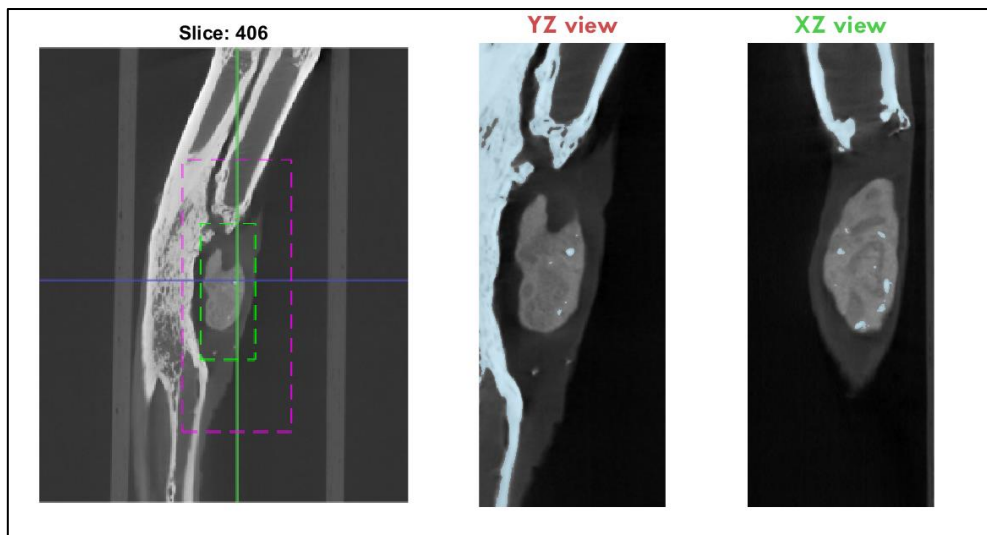
Estudio trabecular



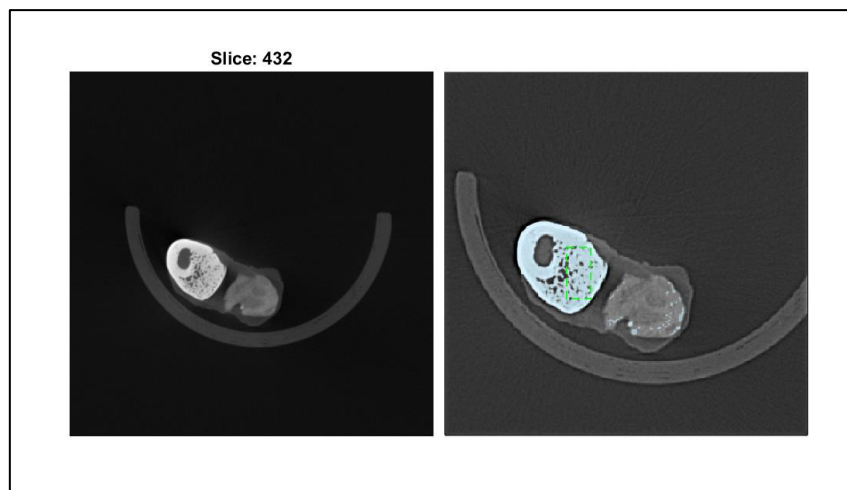
Estudio cortical



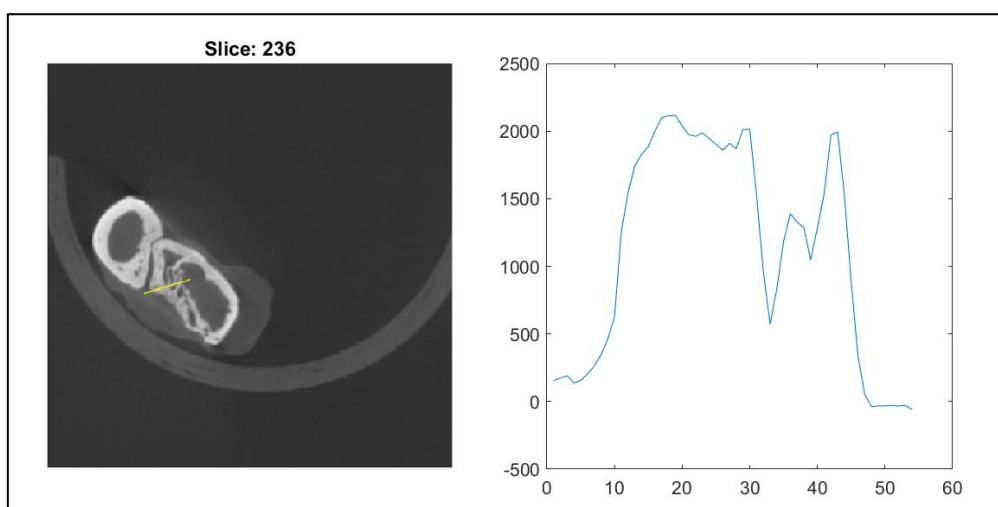


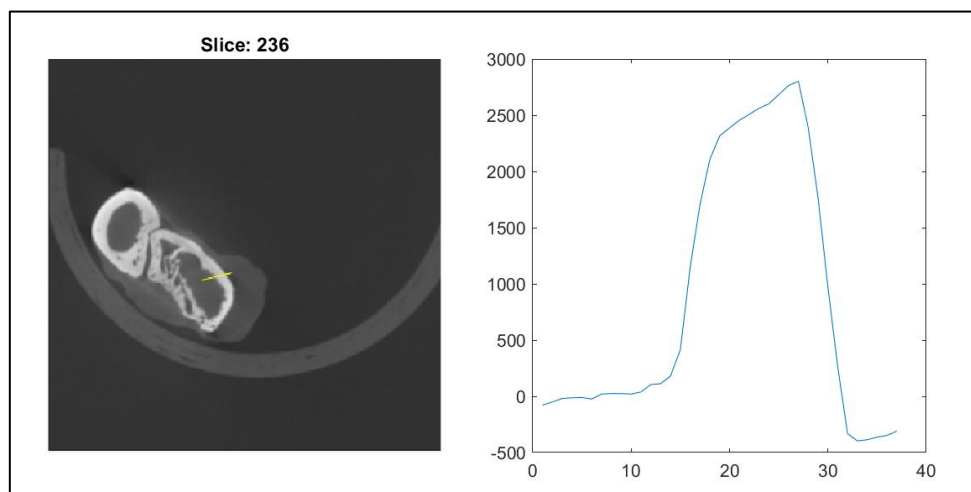
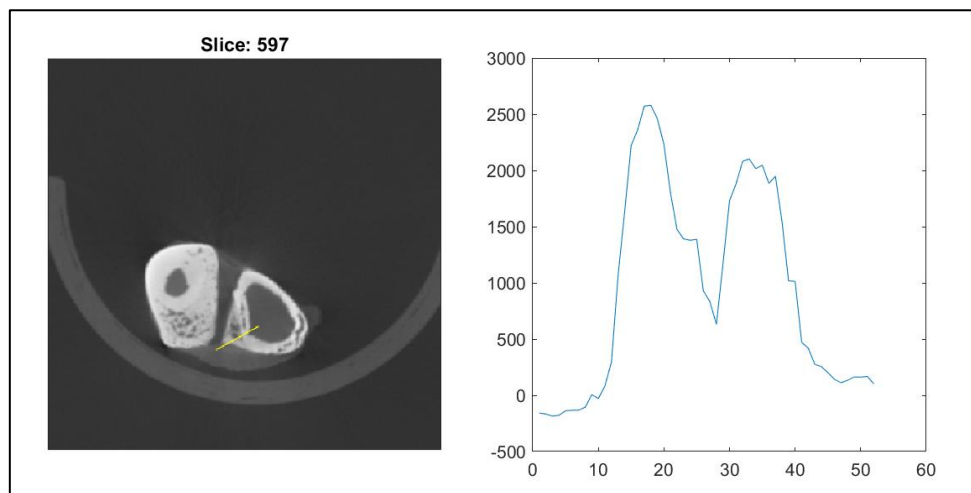
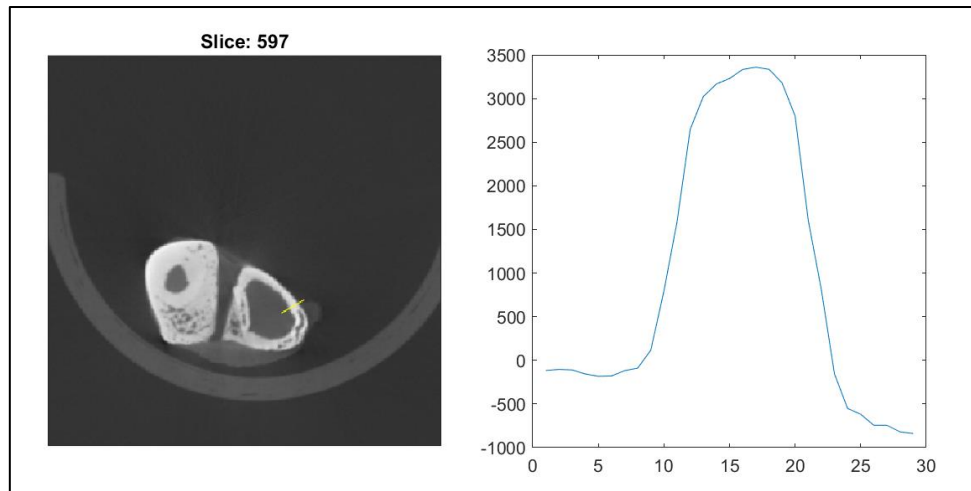


Estudio trabecular



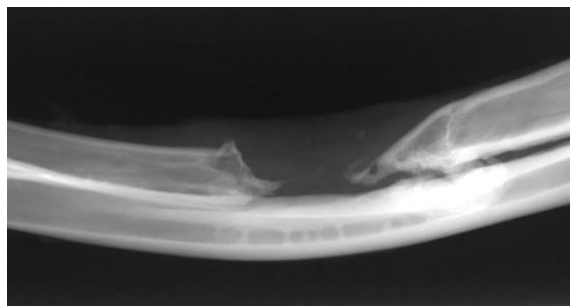
Estudio cortical



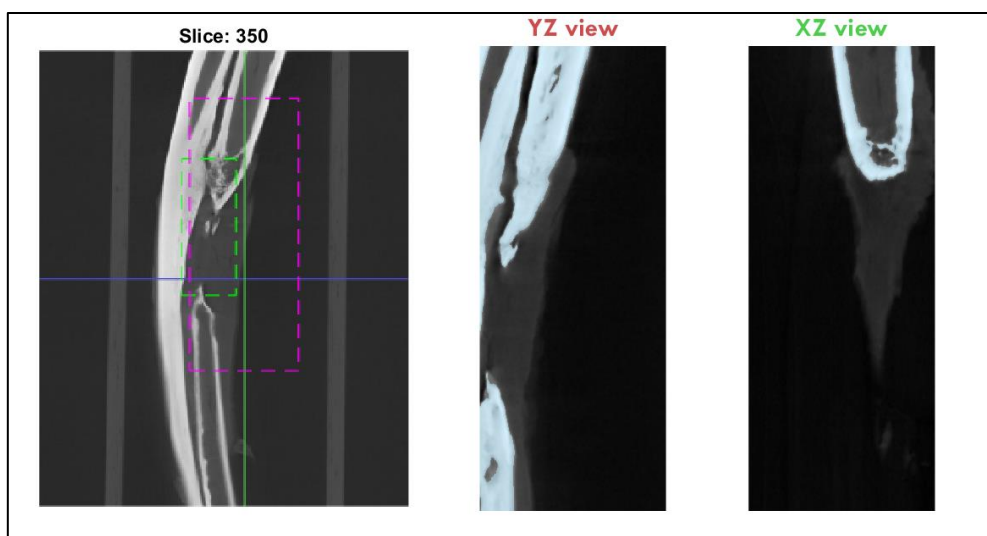
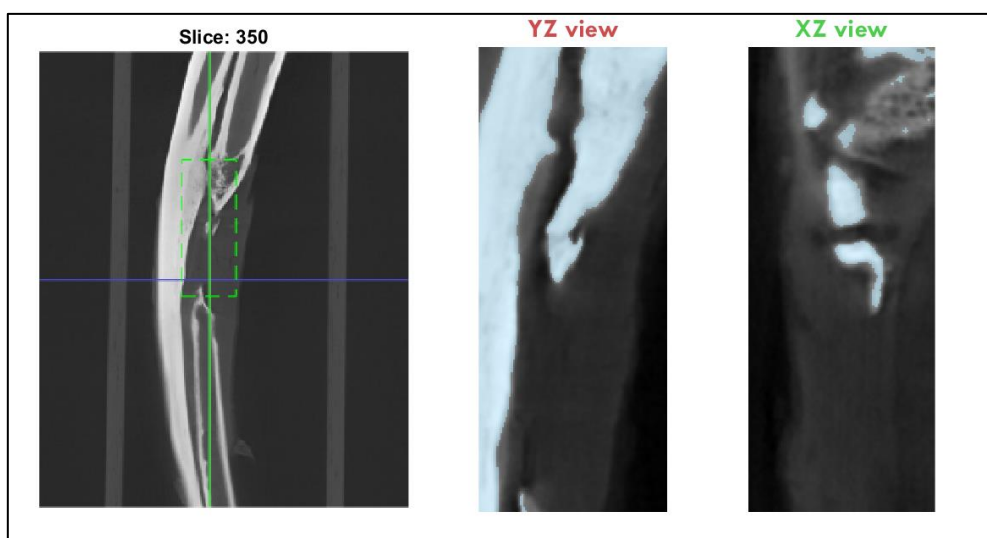


Pixel size (m		0,058													
id	Study name	ROI position	ROI size -X Y	BV(px)	TV(px)	BV/TV	Threshold	Radio	ROI trabecul	ROI cortical	s Tb.N	Tb.Th(mm)	Tb.Sep(mm)	Cortical.Th(n	
0	CT_2226_id_	432	93.33452	1	1453	1740	0,83505747	140	3	142.0172	202.8966	27	0,03112193	1,63638835	0,22724915
1	CT_2226_id_	597	117.4737	115.6316	466.6667	466.6667					367.386	317.0351	435.5439	463.7895	1,64548015
2	CT_2226_id_	597	117.4737	115.6316	466.6667	466.6667					394.4035	421.4211	424.4912	408.5263	0,70218649
3	CT_2226_id_	236	111.3333	151.2456	466.6667	466.6667					222.4737	275.2807	418.3509	402.386	2,09426852
4	CT_2226_id_	236	111.3333	151.2456	466.6667	466.6667					293.7018	329.3158	415.8947	407.2982	0,88930303
5	CT_2226_id_	406	306.6759	2	64844	2000839	0,0324084								
6	CT_2226_id_	406	271.7517	1	1820596	8749578	0,20807815								

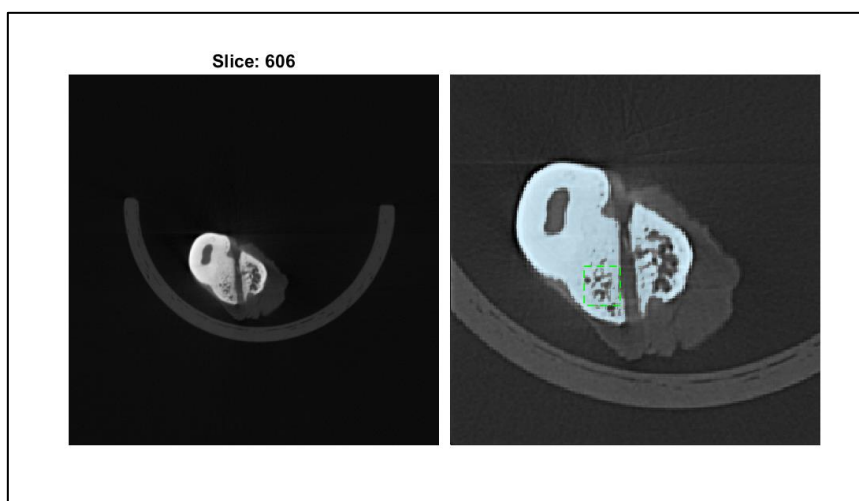
C23: H71624



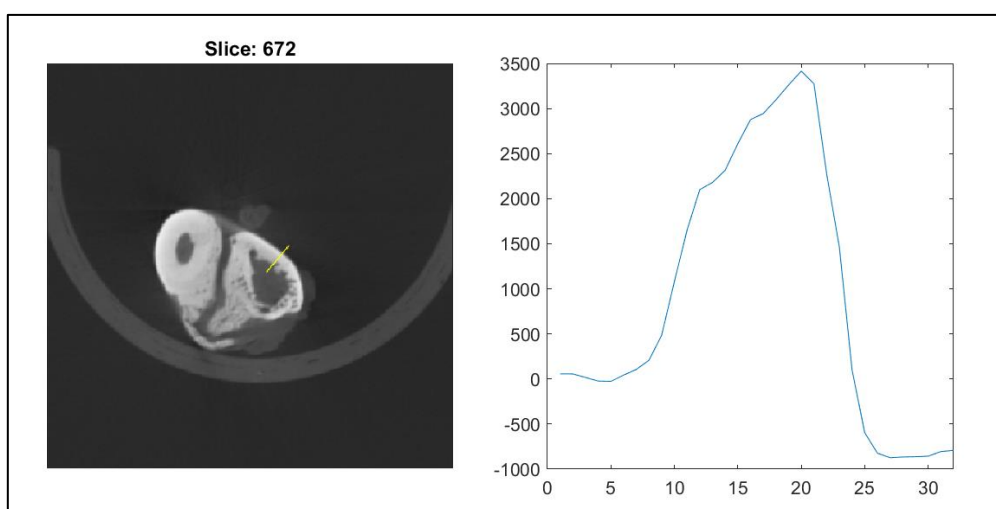
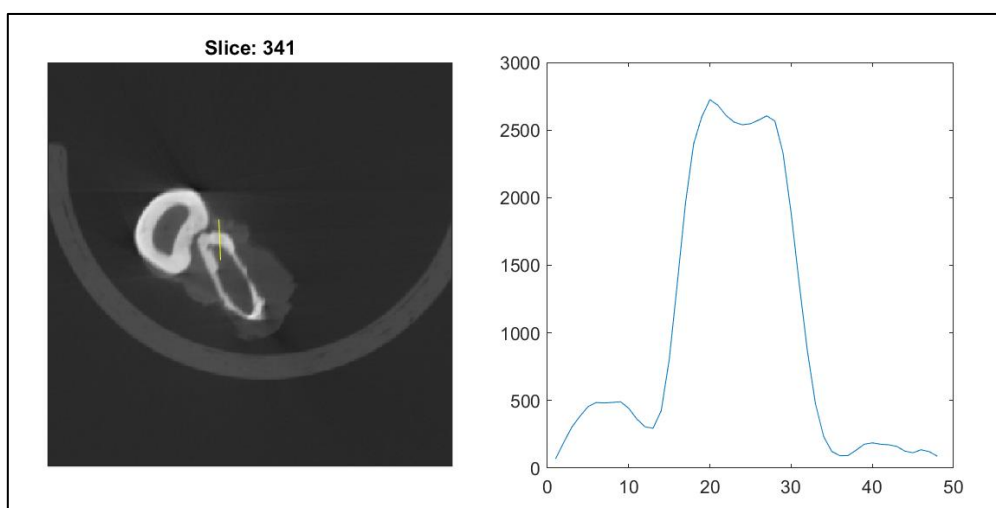
BV/TV

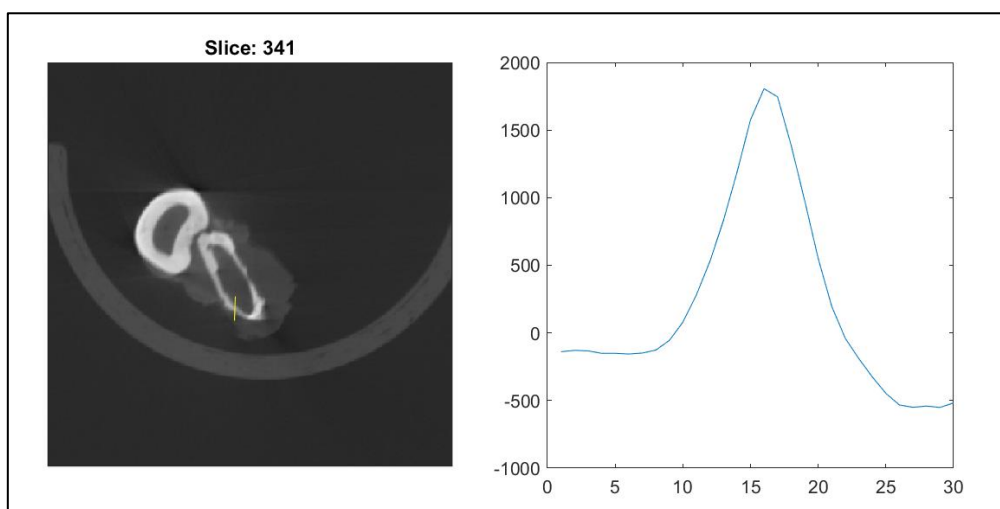
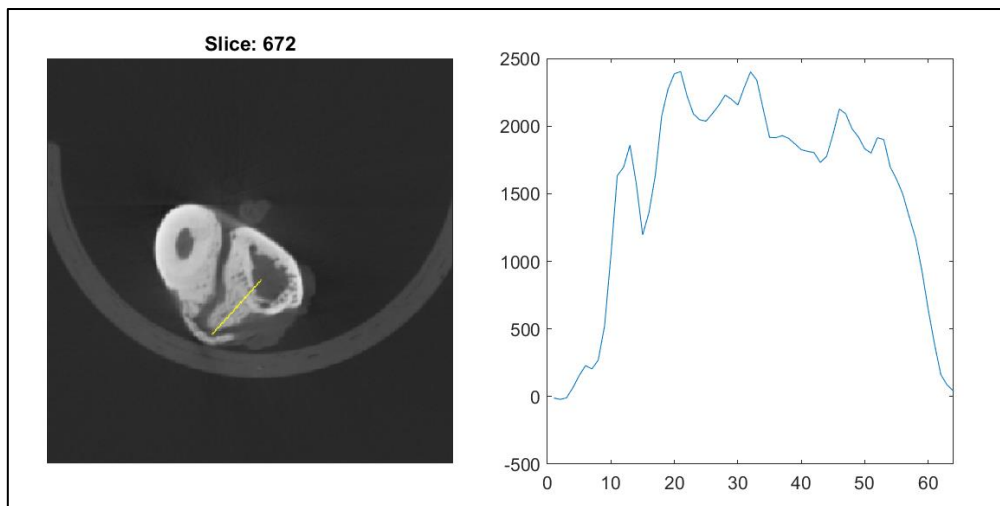


Estudio trabecular



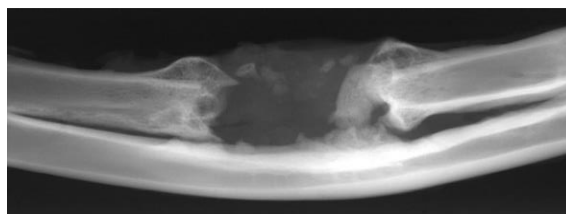
Estudio cortical



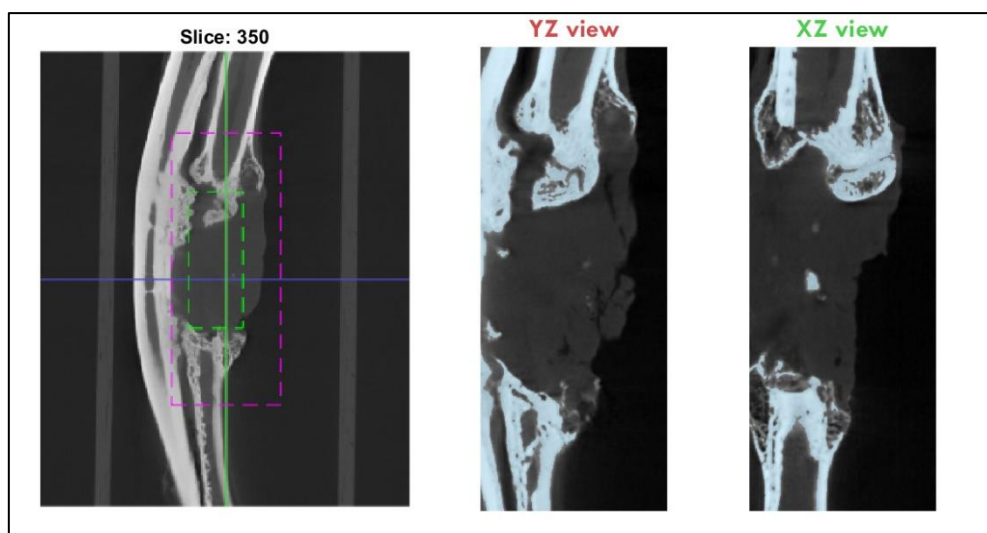
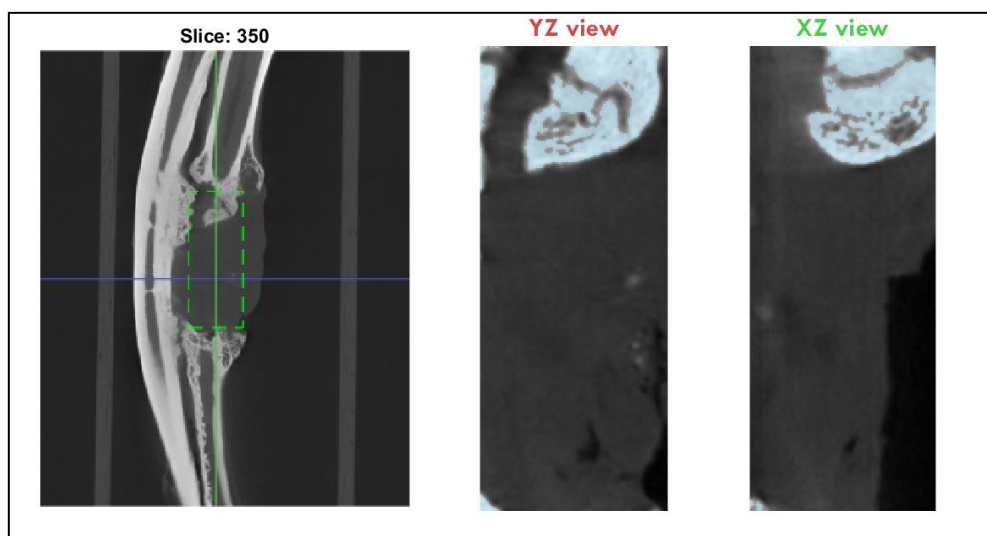


- **Grupo B+C+O 6 semanas**

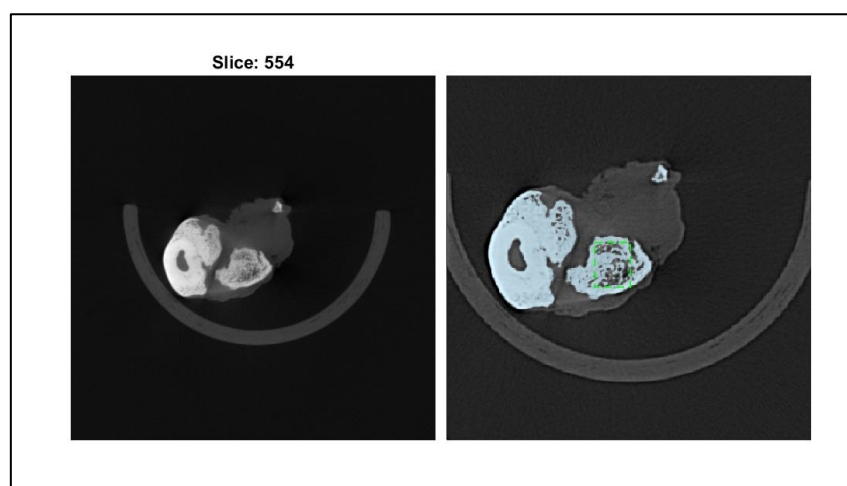
C3: H573807



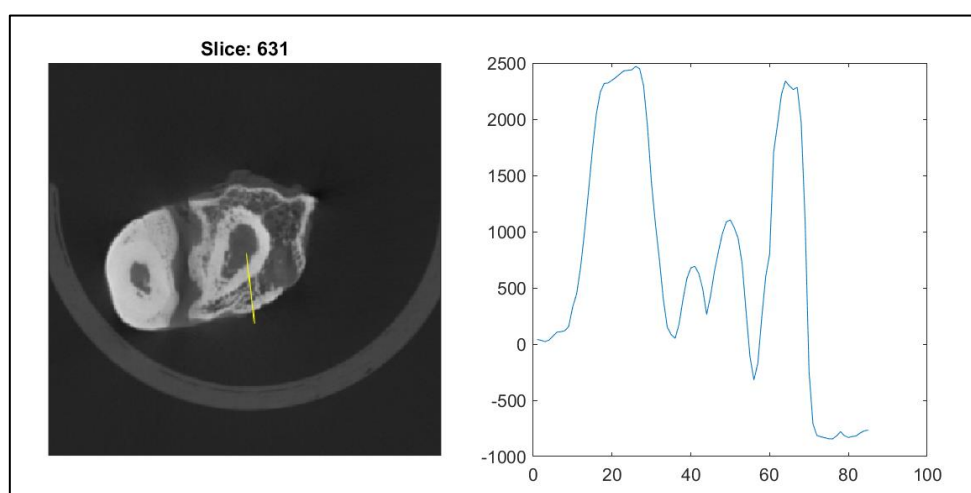
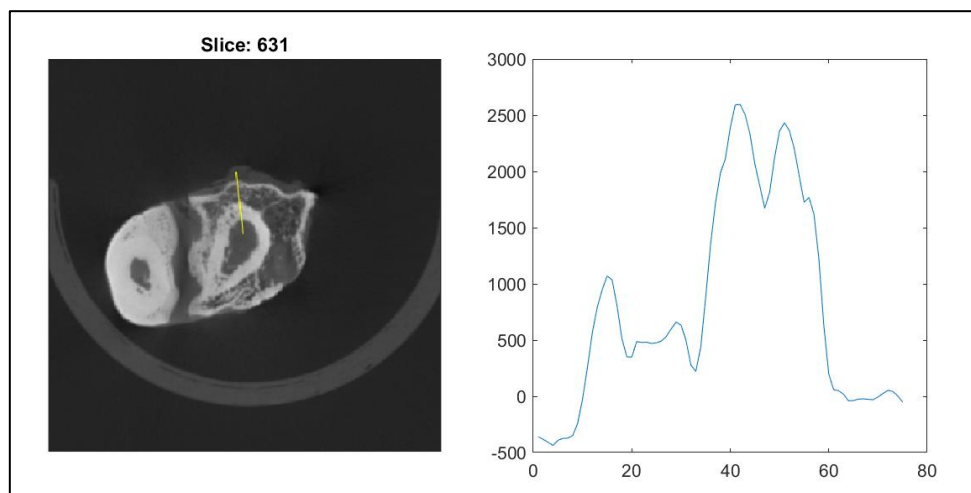
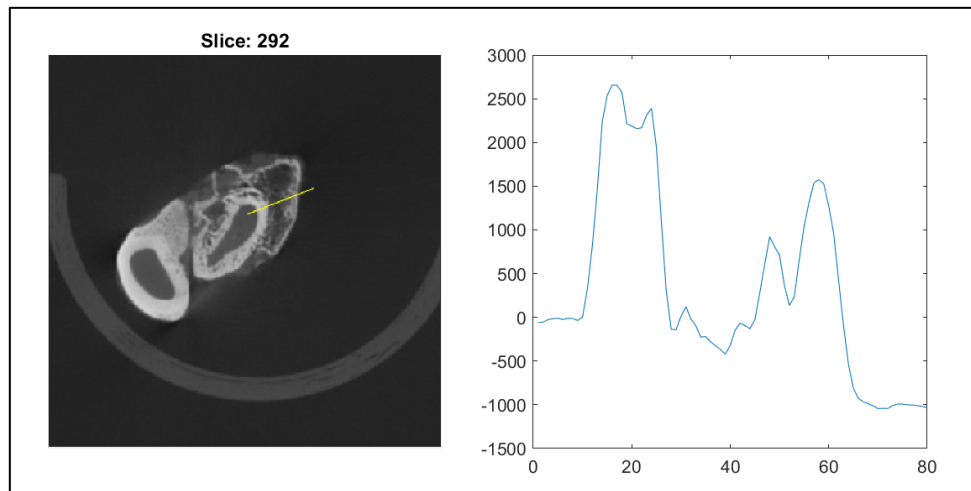
BV/TV

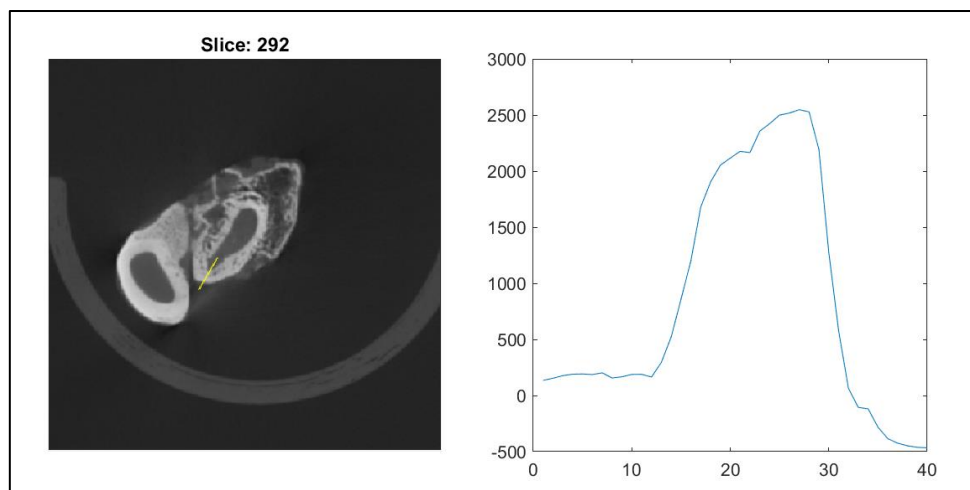


Estudio trabecular



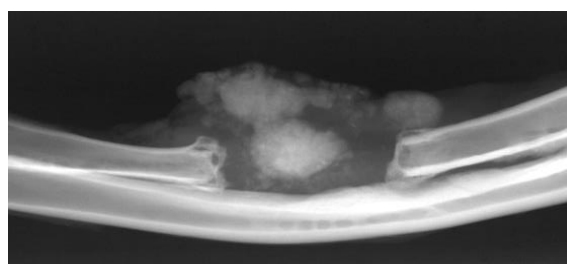
Estudio cortical



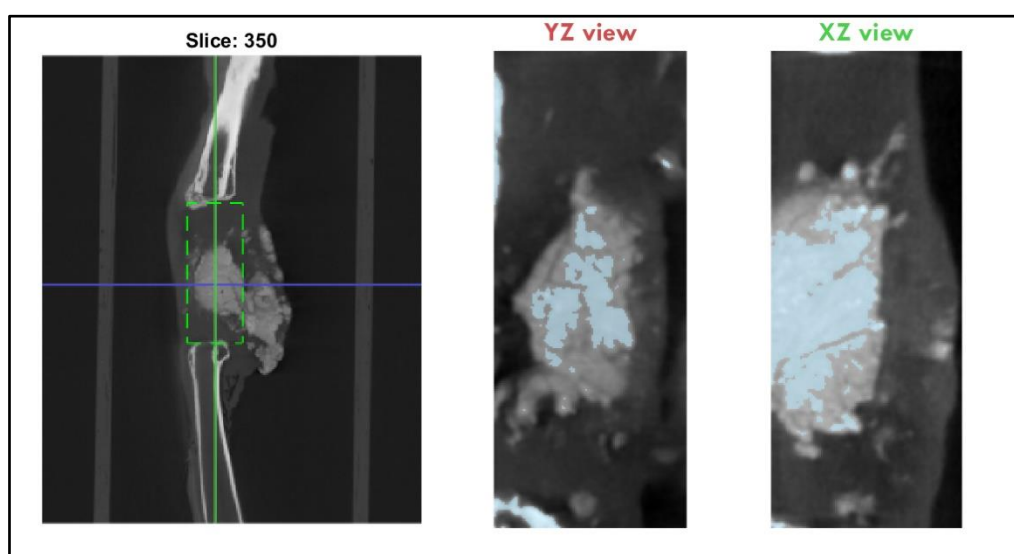


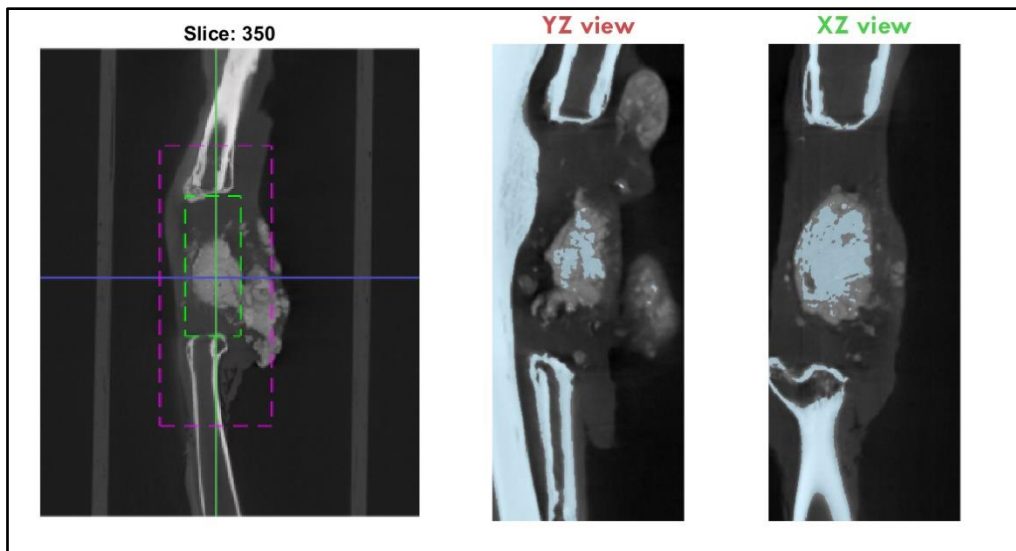
Pixel size (m	0,058															
id	Study name	ROI position	ROI size -X Y	BV(px)	TV(px)	BV/TV	Threshold	Radio	ROI trabecul	ROI cortical s	Tb.N	Tb.Th(mm)	Tb.Sep(mm)	Cortical.Th(n		
0	CT_573807_i	554	124.3717	1	1196	2184	0,54761905	121,5926	3	171.5267	192.8348	41	0,05263357	0,59929158	0,50266667	
1	CT_573807_i	631	119.3158	104.5789	466.6667	466.6667					354.4912	364.3158	331.1579	414.6667		3,37518912
2	CT_573807_i	631	119.3158	104.5789	466.6667	466.6667					342.2105	350.807	239.0526	312.7368		2,74893974
3	CT_573807_i	292	103.9649	107.6491	466.6667	466.6667					340.3684	418.9649	297.386	266.6842		2,92182686
4	CT_573807_i	292	103.9649	107.6491	466.6667	466.6667					304.7544	282.6491	345.2807	383.3509		0,96614433
5	CT_573807_i	350	281.4759	3	247763	2380602	0,10407578									
6	CT_573807_i	350	249.3517	1	2640209	11237096	0,23495474									

C18: 900046000192224

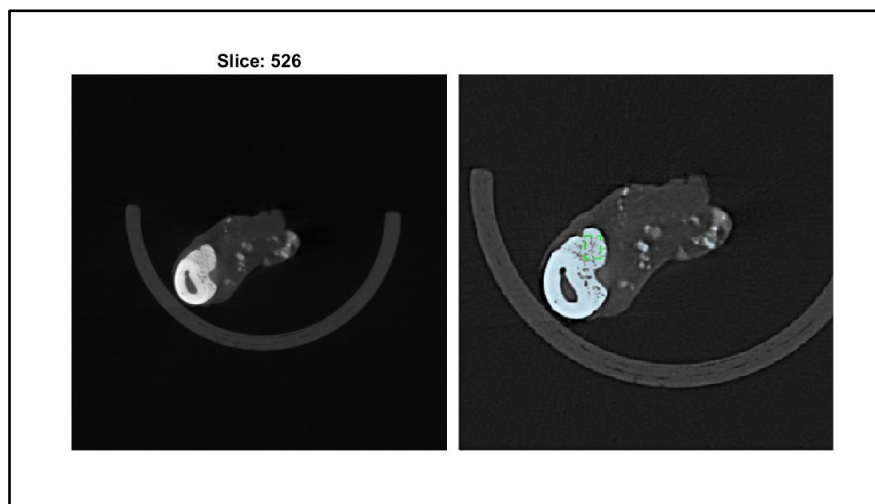


BV/TV

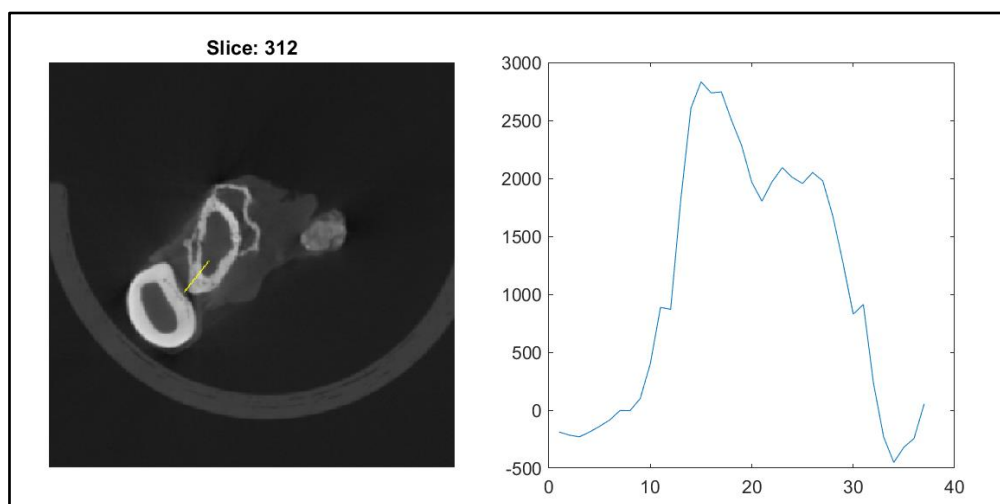


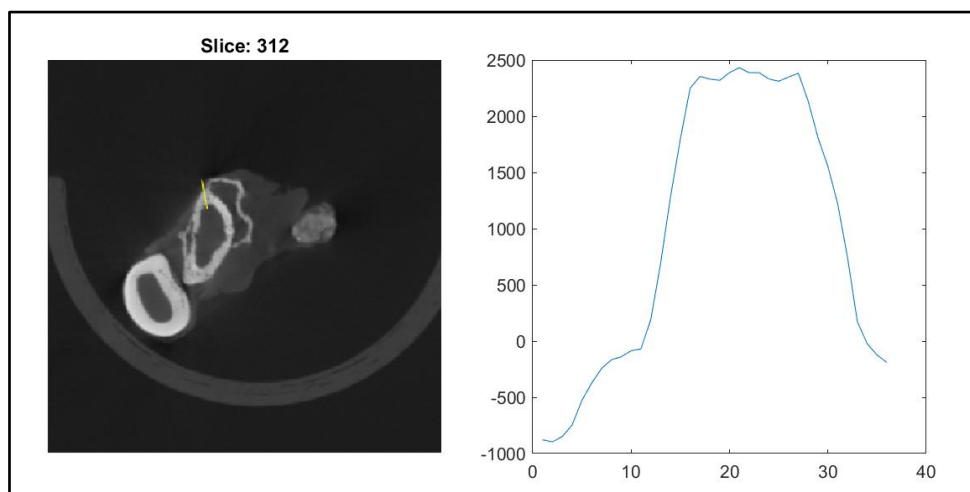
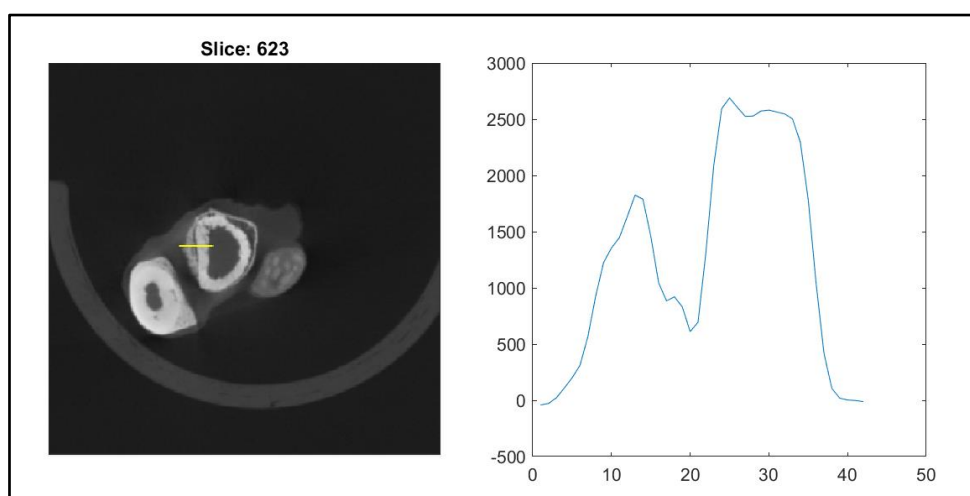
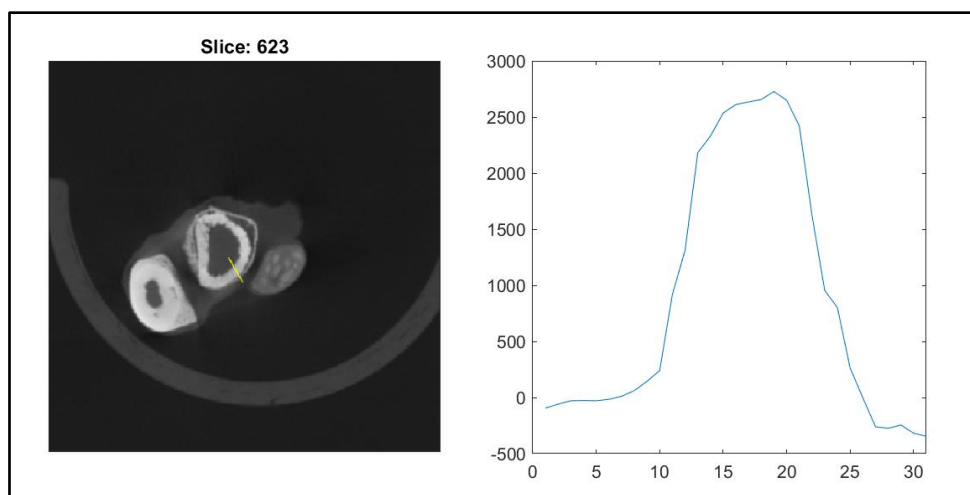


Estudio trabecular



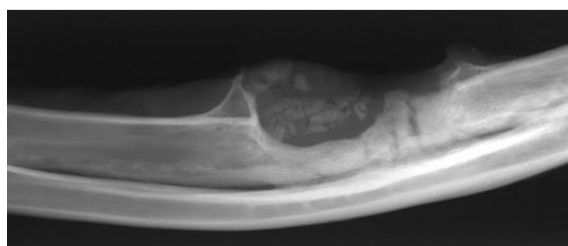
Estudio cortical



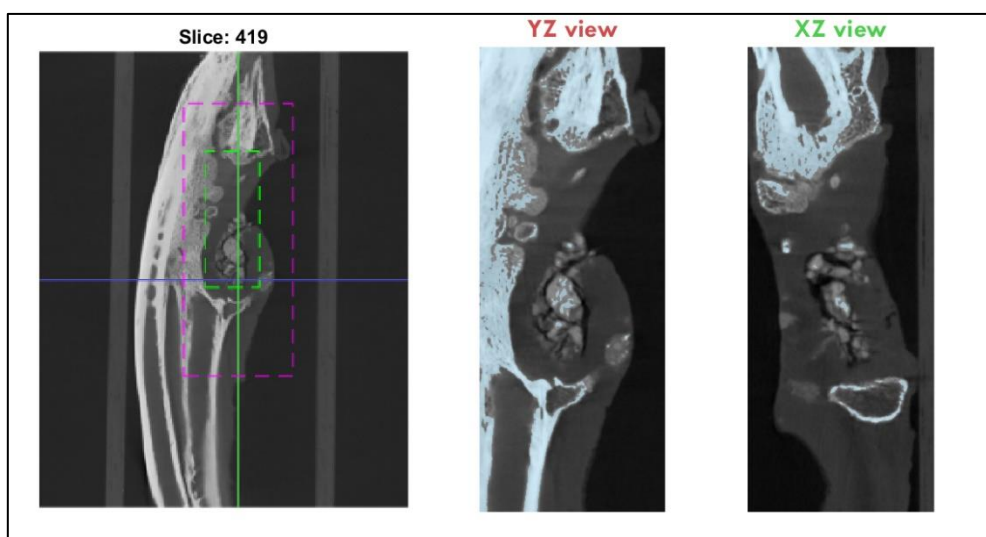
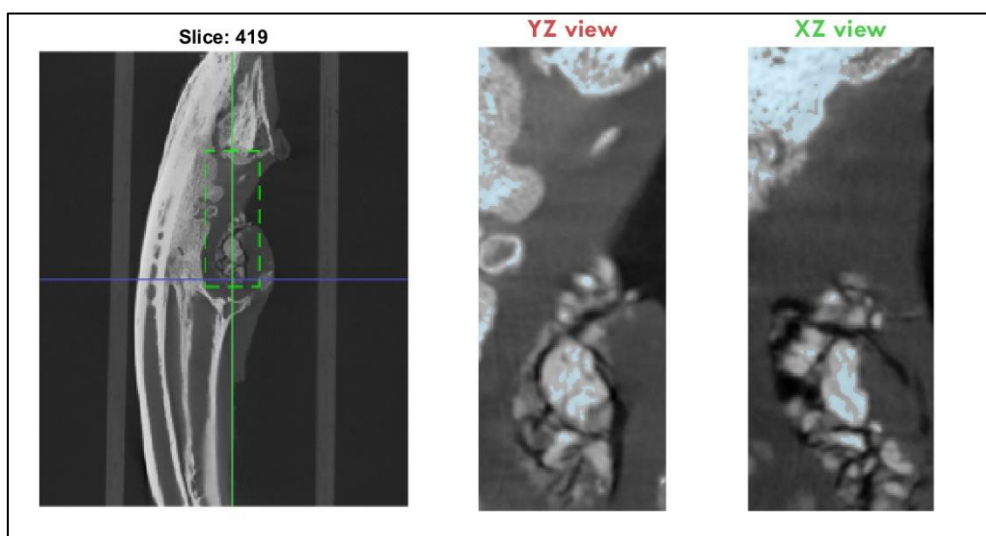


Pixel size (m		0,058													
id	Study name	ROI position	ROI size -X Y	BV(px)	TV(px)	BV/TV	Threshold	Radio	ROI trabecul	ROI cortical	Tb.N	Tb.Th(mm)	Tb.Sep(mm)	Cortical.Th(n	
0	CT_2224_id	526	86.68369	1	359	513	0,69980507	156,668551	3	141.598	181.3633	18.0	0,05450019	0,77839252	0,285824
1	CT_2224_id	623	107.6491	102.1228	466.6667	466.6667					263	303.5263	320.1053	320.1053	1,73424979
2	CT_2224_id	623	107.6491	102.1228	466.6667	466.6667					321.9474	339.1403	337.2982	366.7719	0,81181377
3	CT_2224_id	312	104.5789	104.5789	466.6667	466.6667					288.1754	259.9298	334.8421	370.4561	1,21876167
4	CT_2224_id	312	104.5789	104.5789	466.6667	466.6667					286.9474	293.0877	248.8772	283.2632	1,12226366
5	CT_2224_id	350	267.4759	3	262726	2325907	0,11295636								
6	CT_2224_id	350	221.3517	1	2705907	11343403	0,23854455								

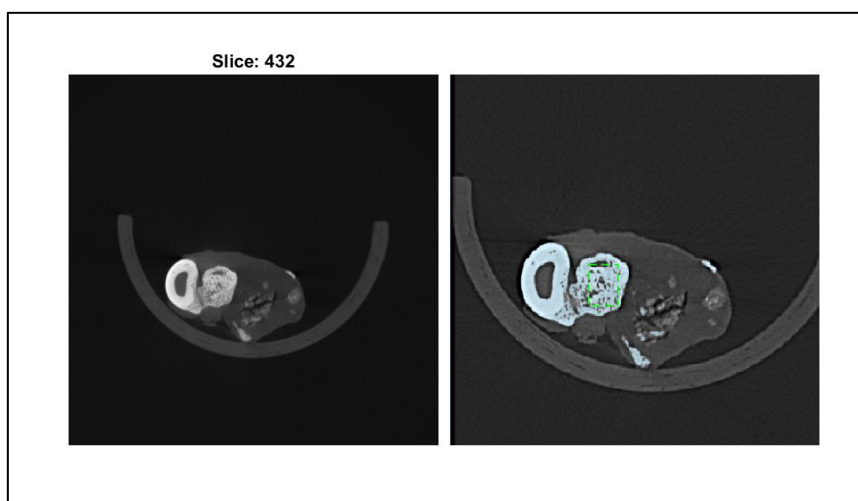
C22: 900046000192229



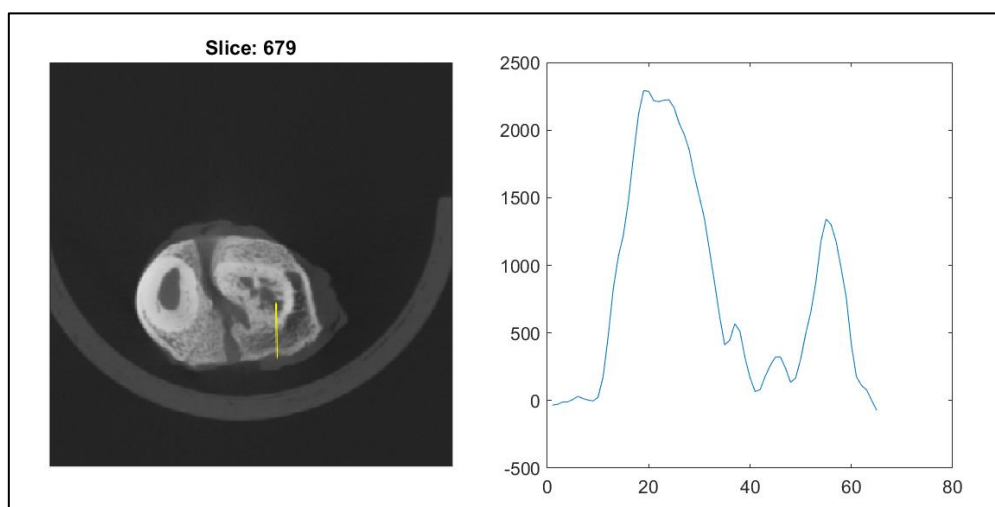
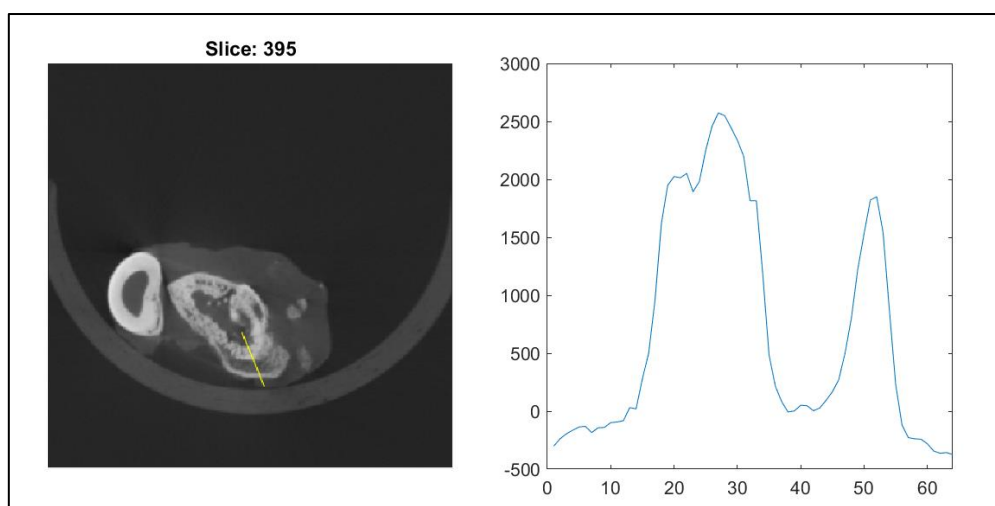
BV/TV

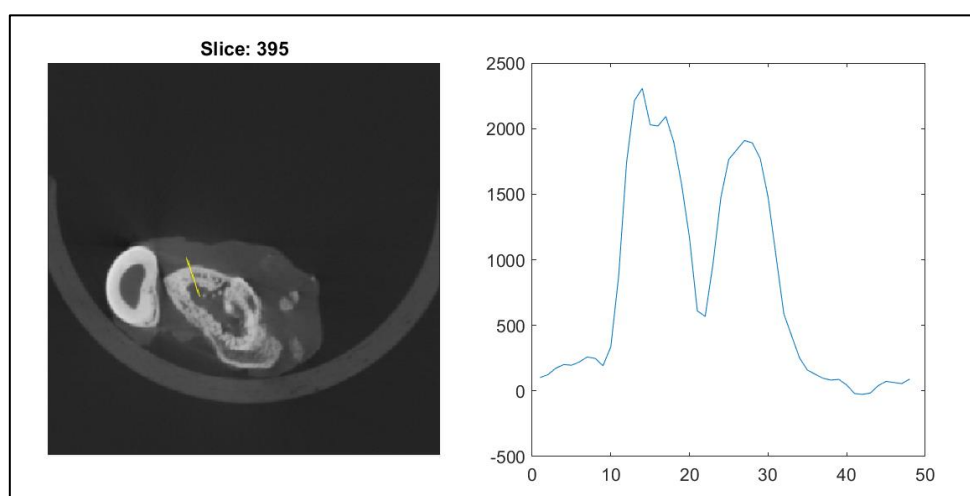
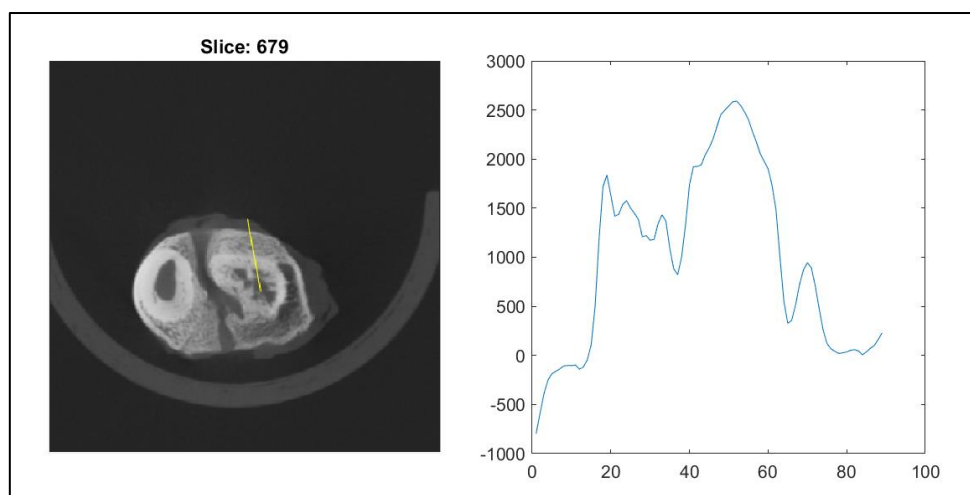


Estudio trabecular



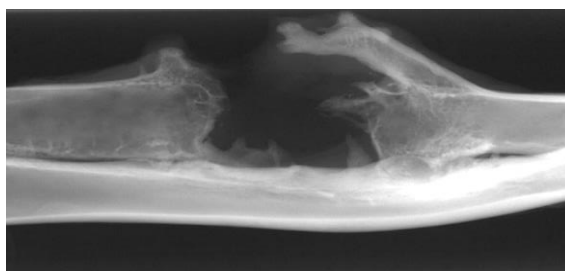
Estudio cortical



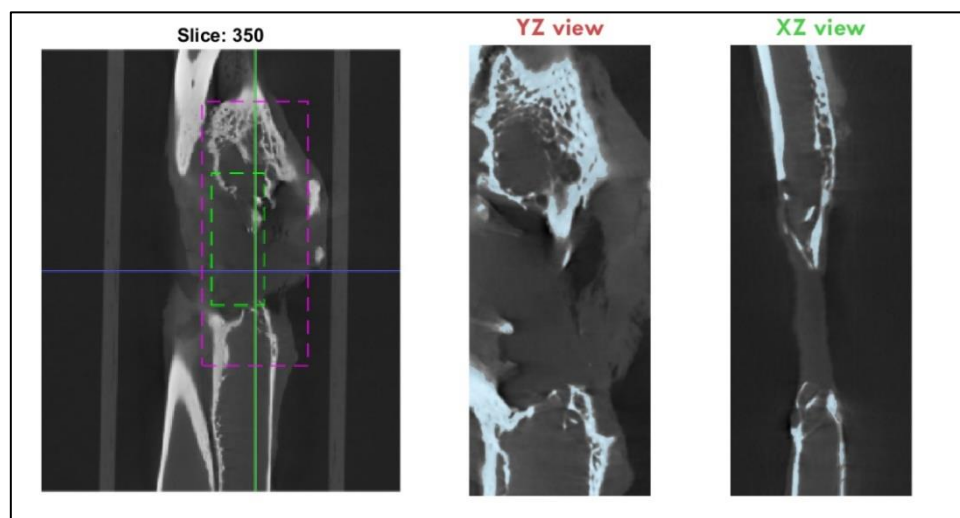
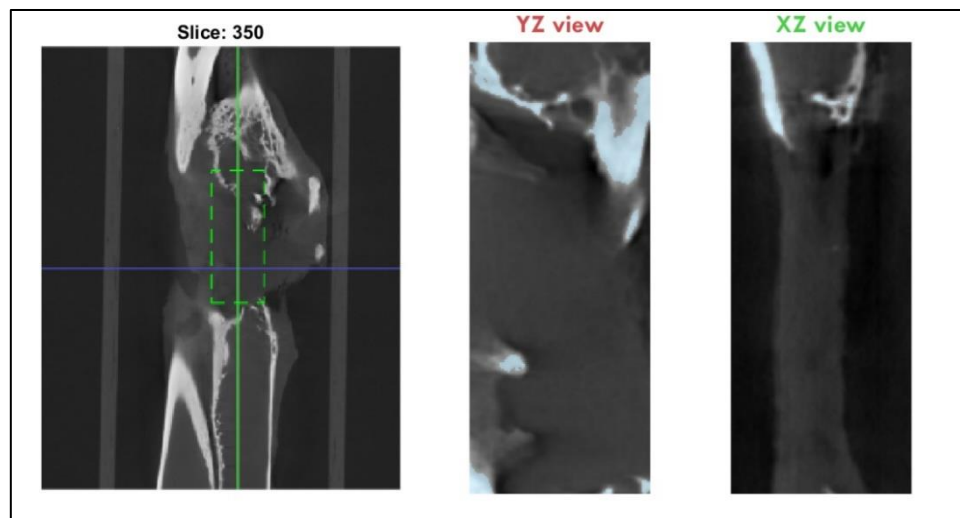


id	Study name	ROI position	ROI size -X-Y	BV(px)	TV(px)	BV/TV	Threshold	Radio	ROI trabecul	ROI cortical s	Tb.N	Tb.Th(mm)	Tb.Sep(mm)	Cortical.Th(n	Profile
0	CT_2229_id	432	94.99723	1	1166	1598	0,72966208	133,084507	3	158.5576	215.7802	33	0,044977	0,99819926	0,29134884
1	CT_2229_id	679	132.2105	119.9298	466.6667	466.6667					368.614	384.579	308.4386	395.6316	3,23206402 -796 -588 -34
2	CT_2229_id	679	132.2105	119.9298	466.6667	466.6667					394.4035	395.6316	398.0877	461.9474	2,77902139 -34 -28 -11
3	CT_2229_id	395	110.7193	130.3684	466.6667	466.6667					334.8421	360.6316	441.6842	504.3158	2,23454263 -302 -238 -19
4	CT_2229_id	395	110.7193	130.3684	466.6667	466.6667					275.8947	291.8597	363.0877	409.7544	1,26953011 102 124 173
5	CT_2229_id	419	315.0759	4	211344	2521892	0,08380375								
6	CT_2229_id	419	274.5517	2	2738619	13158117	0,20813153								

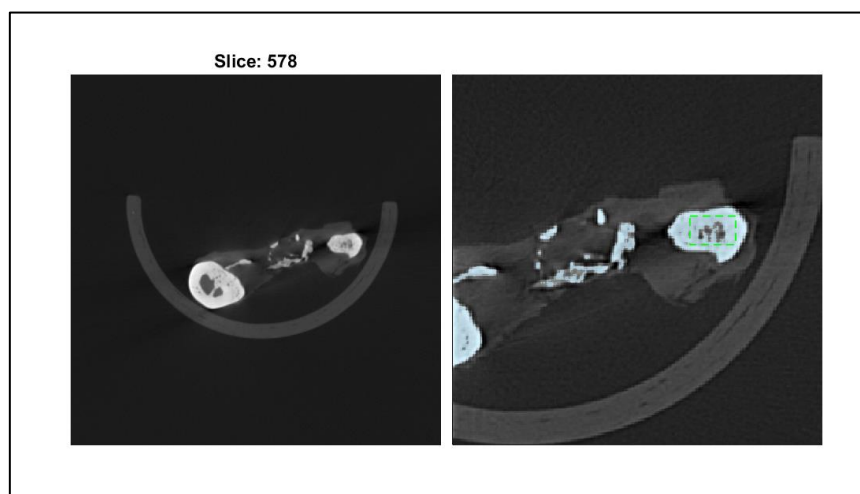
- **Grupo B+C+O 12 semanas**

C6: H61401

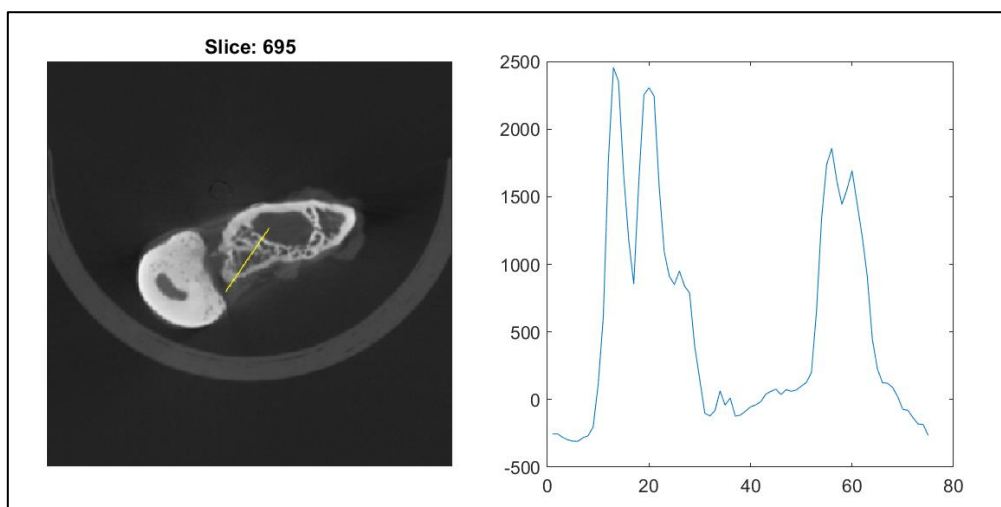
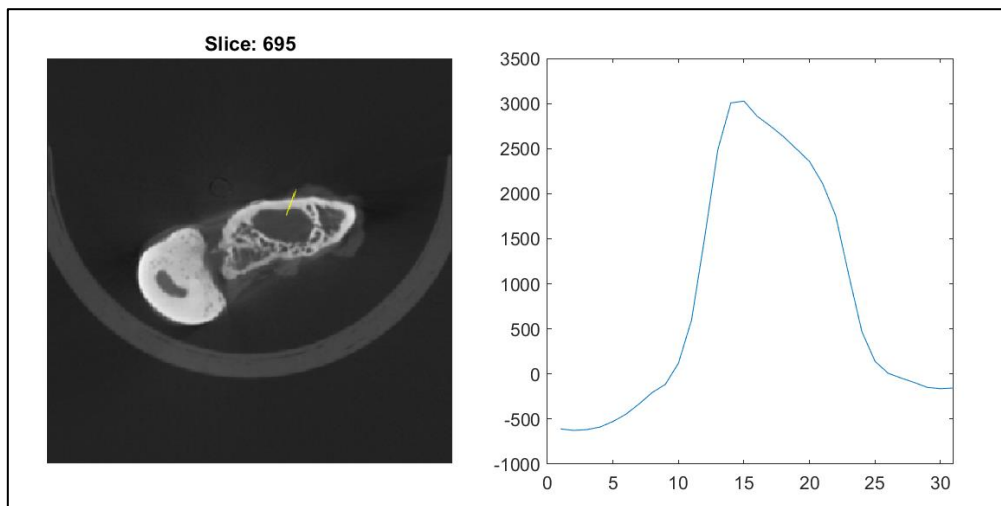
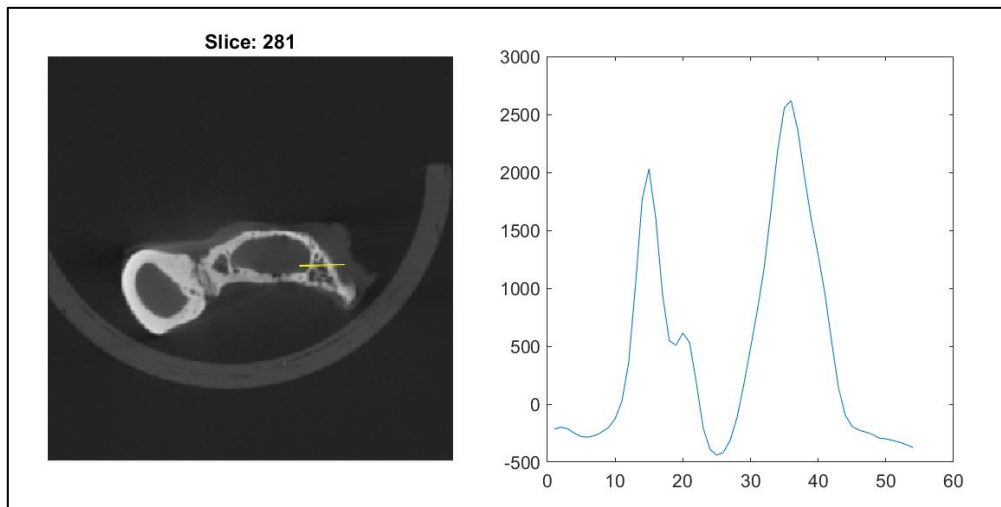
BV/TV

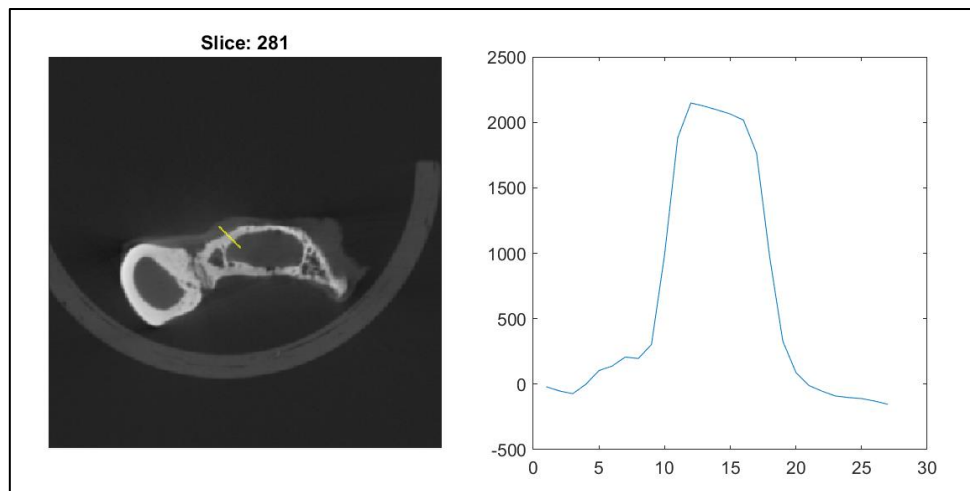


Estudio trabecular



Estudio cortical



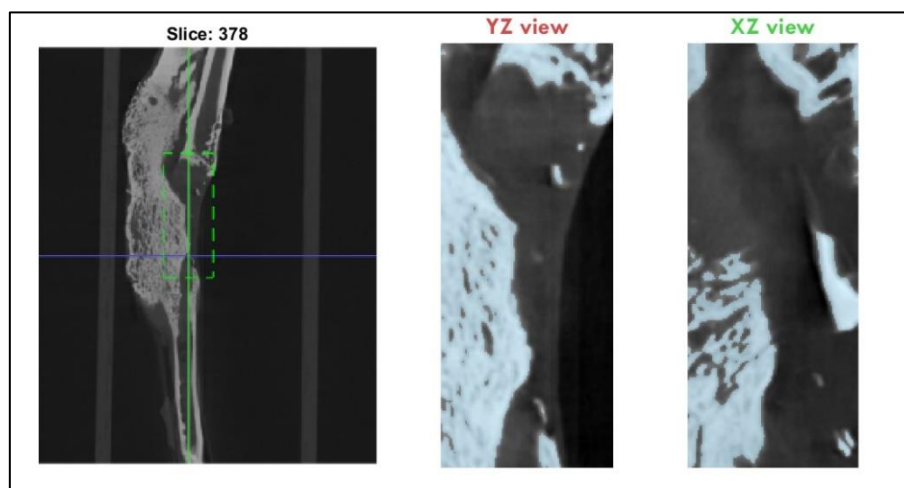


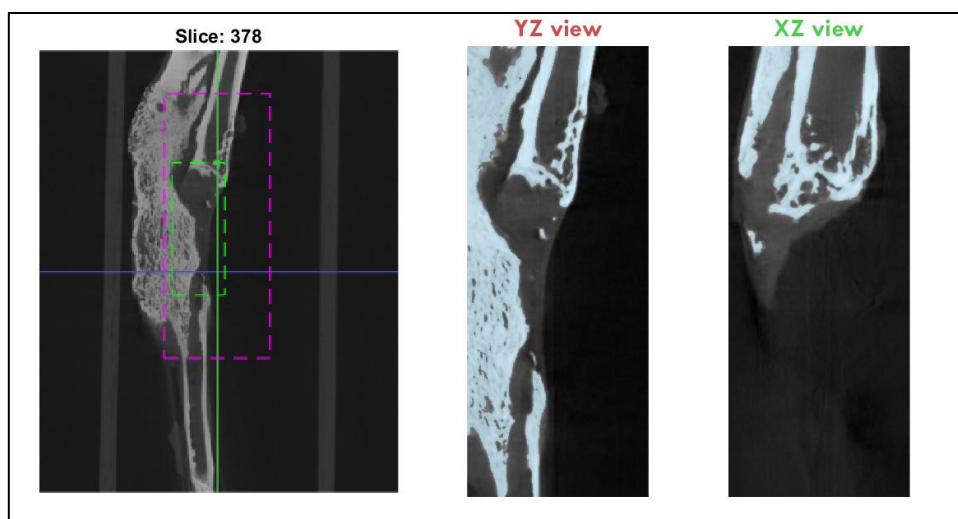
Pixel size (m		0,058													
id	Study name	ROI position	ROI size -X Y	BV(px)	TV(px)	BV/TV	Threshold	Radio	ROI trabecul	ROI cortical	sTb.N	Tb.Th(mm)	Tb.Sep(mm)	Cortical.Th(n)	
0	CT_61401_id	578	304.4984	1	1372	1749	0,78444826	139,38635	3	270.2916	160.9108	52	0,02330694	1,97704348	0,51148538
1	CT_61401_id	695	130.3684	129.7544	466.6667	466.6667				386.421	336.0702	321.9474	395.6316		3,08000269
2	CT_61401_id	695	130.3684	129.7544	466.6667	466.6667				417.1228	406.0702	281.4211	310.8947		0,74009157
3	CT_61401_id	281	148.1754	117.4737	466.6667	466.6667				437.386	490.193	360.0175	358.7895		1,72239729
4	CT_61401_id	281	148.1754	117.4737	466.6667	466.6667				350.193	375.9825	320.7193	346.5088		0,54785205
5	CT_61401_id	350	331.8759	3	76734	1262841	0,06076299								
6	CT_61401_id	350	313.7517	2	1438952	7748955	0,18569626								

C7: H81260

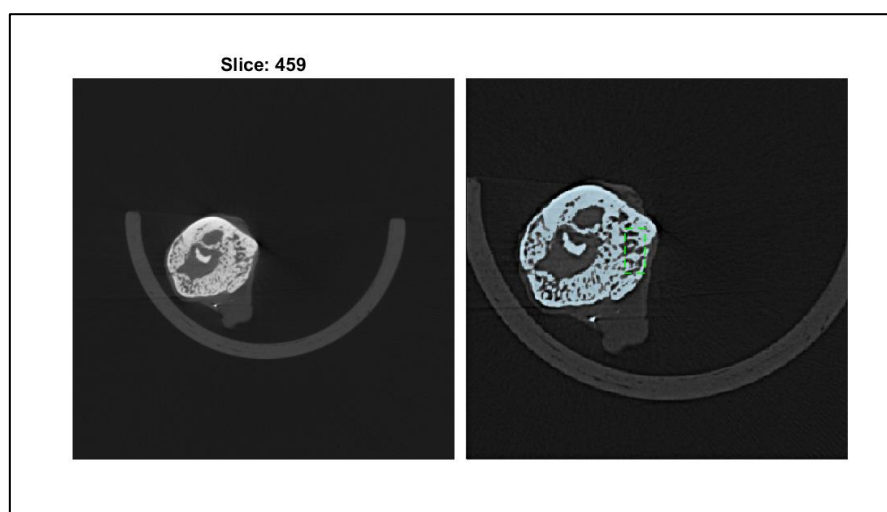


BV/TV

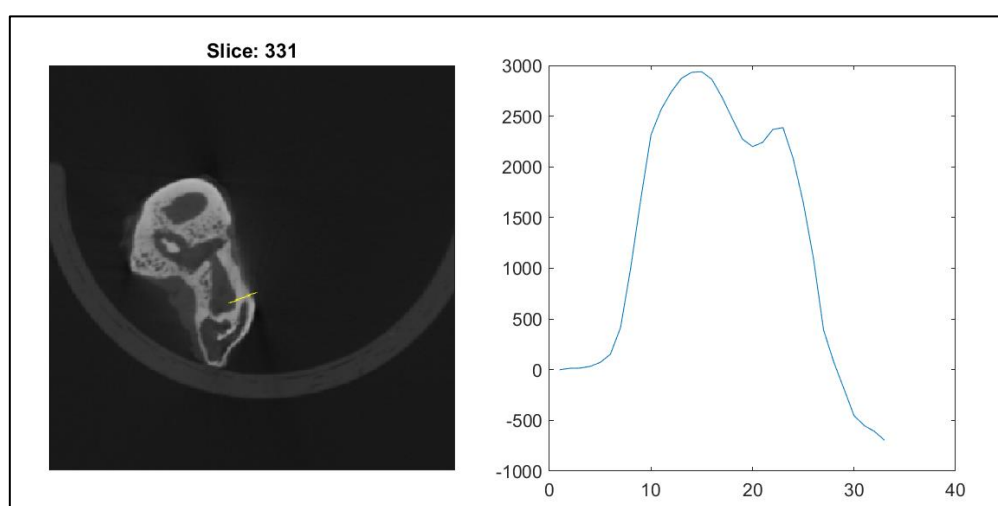


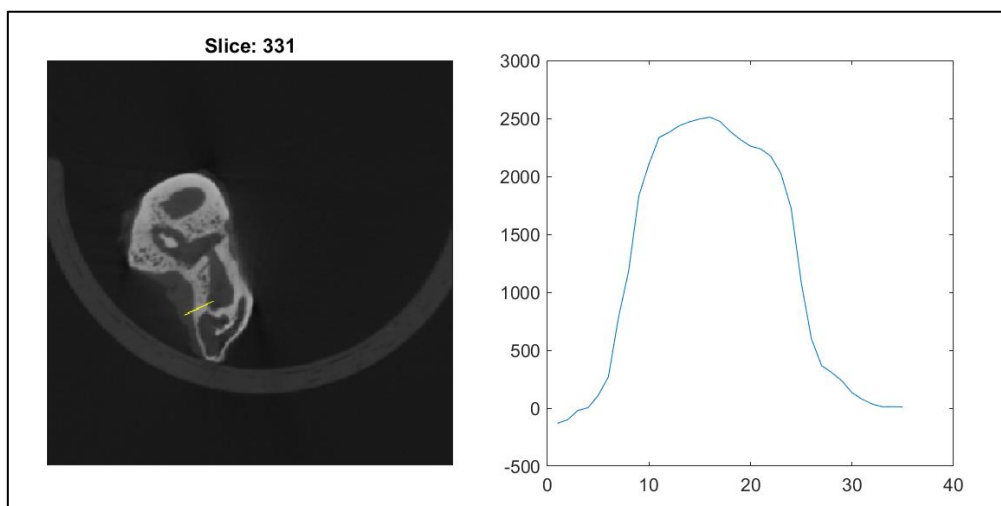
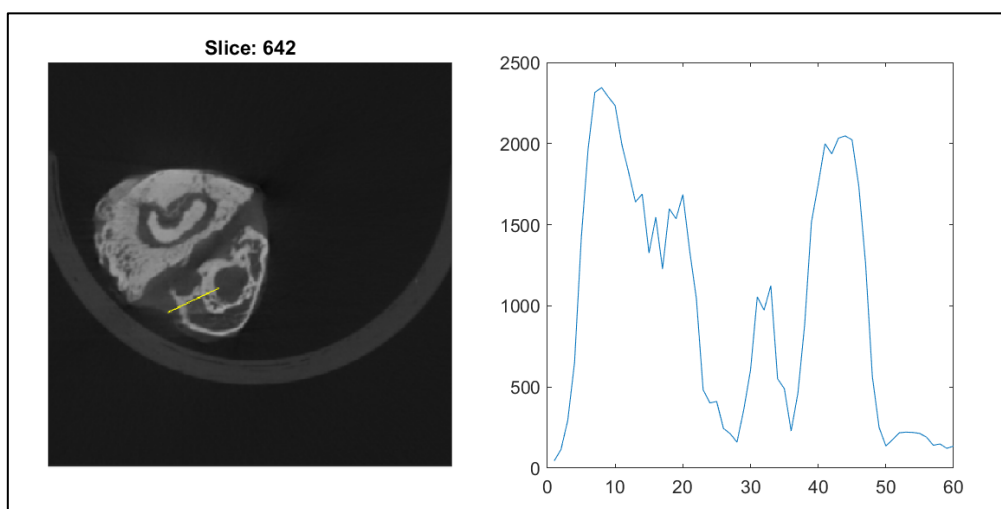
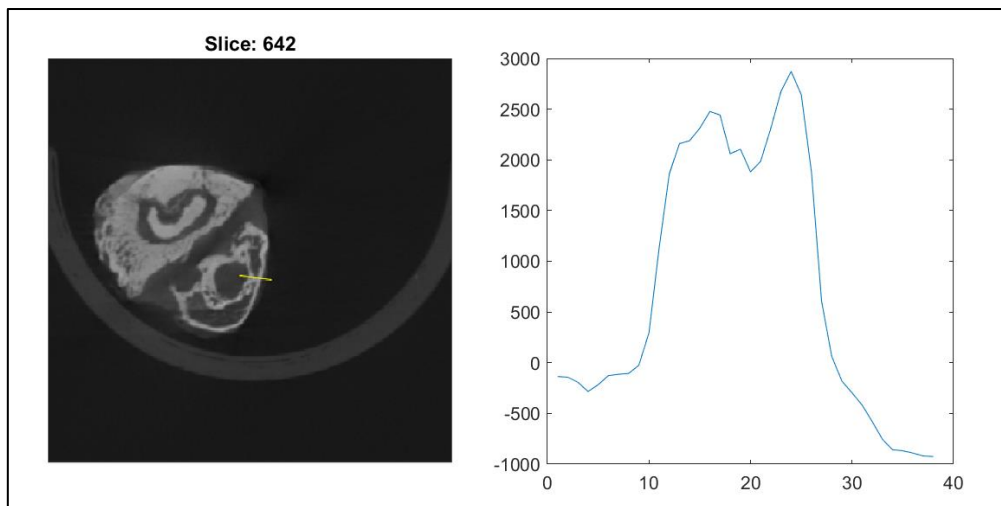


Estudio trabecular



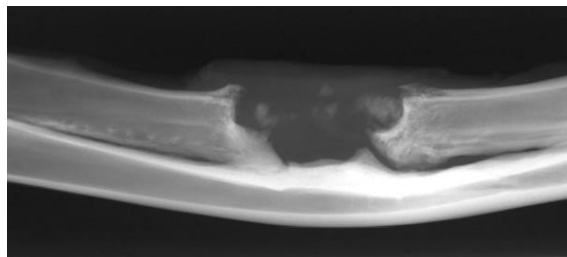
Estudio cortical



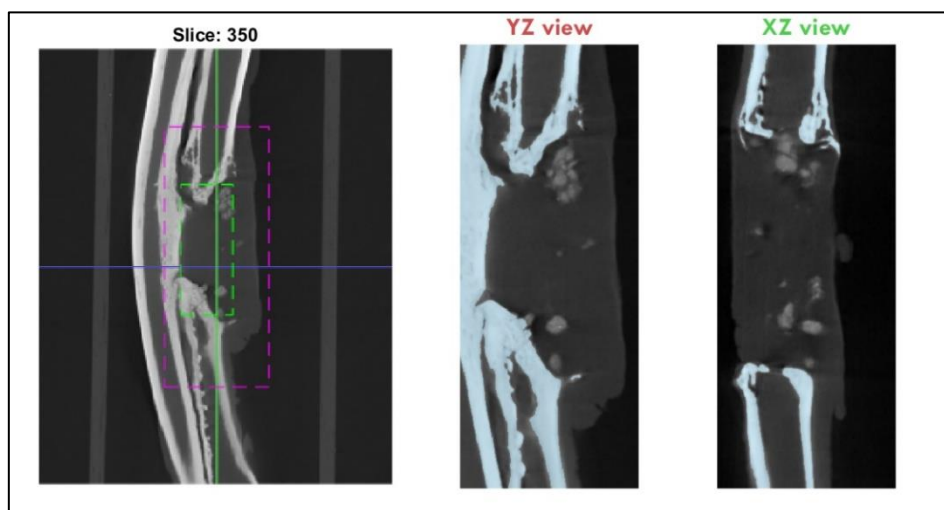
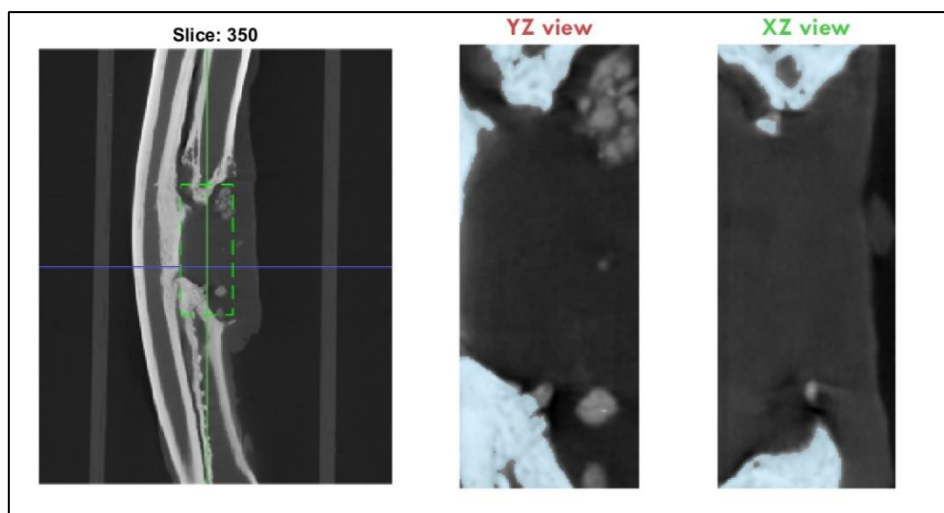


Pixel size (m)	0,058														
id	Study name	ROI position	ROI size -X Y	BV (px)	TV (px)	BV/TV	Threshold	Radio	ROI trabecul	ROI cortical	s Tb.N	Tb.Th(mm)	Tb.Sep(mm)	Cortical.Th(r	
0	CT_81260_id	459	107.7447	1	509	1150	0,4426087	120,10265	3	175.5172	165.8989	22	0,04777366	0,54418433	0,66987387
1	CT_81260_id	642	118.7018	142.0351	466.6667	466.6667					315.807	256.8596	403	431.2456	2,56264606
2	CT_81260_id	642	118.7018	142.0351	466.6667	466.6667					340.3684	377.2105	393	1754	0,96238309
3	CT_81260_id	331	105.193	132.8246	466.6667	466.6667					312.1228	344.0526	407	2982	1,12482283
4	CT_81260_id	331	105.193	132.8246	466.6667	466.6667					296.1579	263	410	9825	1,15459659
5	CT_81260_id	378	259.0759	3	760924	2240151	0,33967532								
6	CT_81260_id	378	243.7517	2	3909371	9895114	0,39508095								

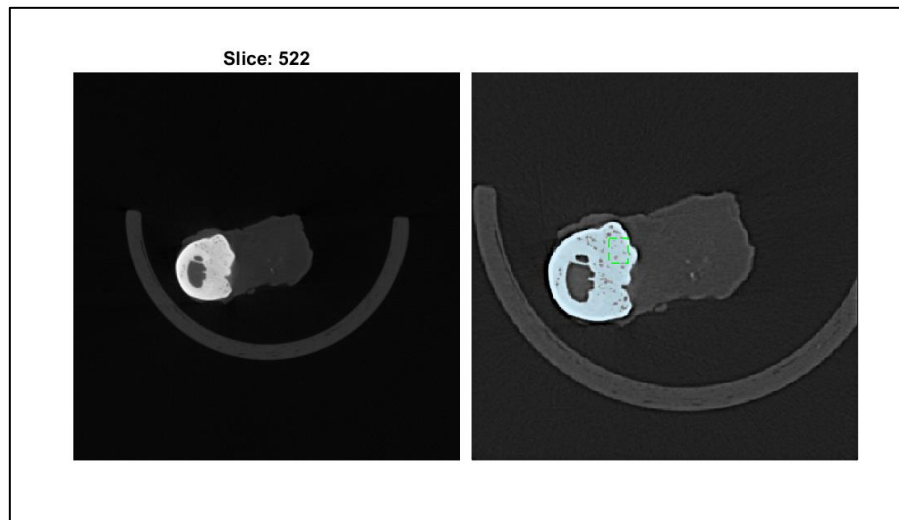
C21: 900046000192227



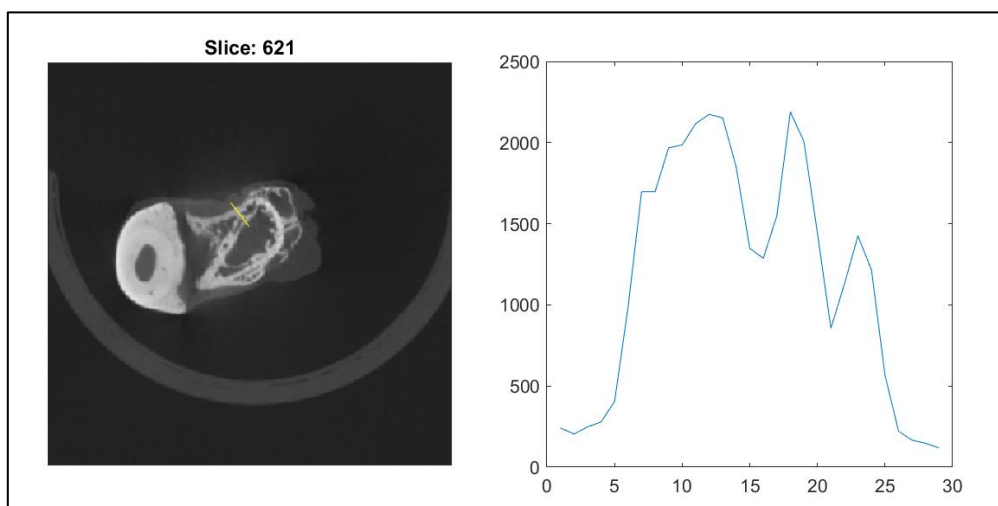
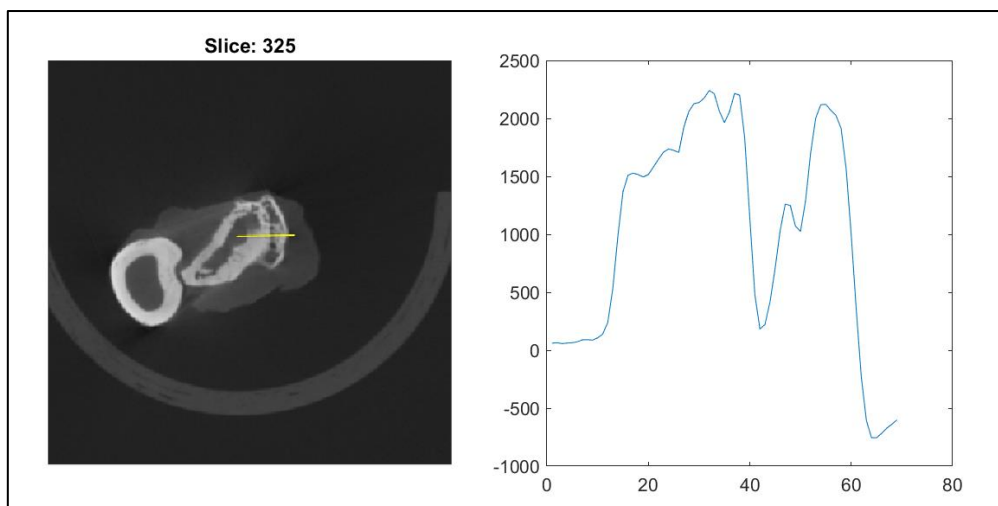
BV/TV

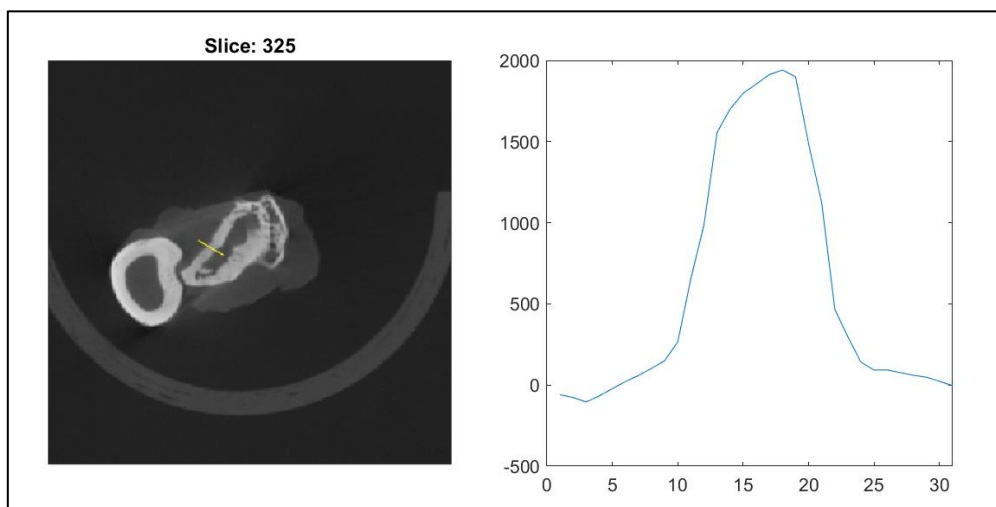


Estudio trabecular



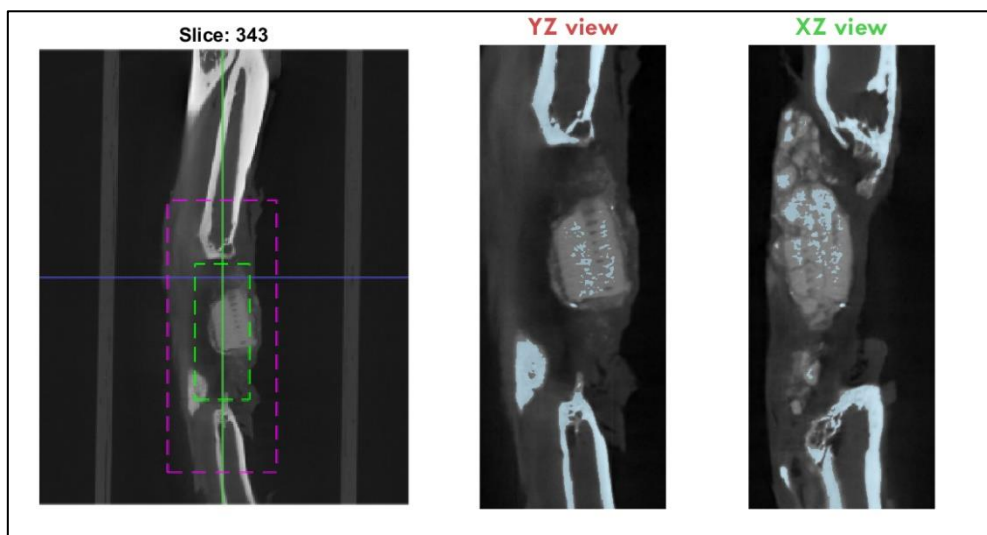
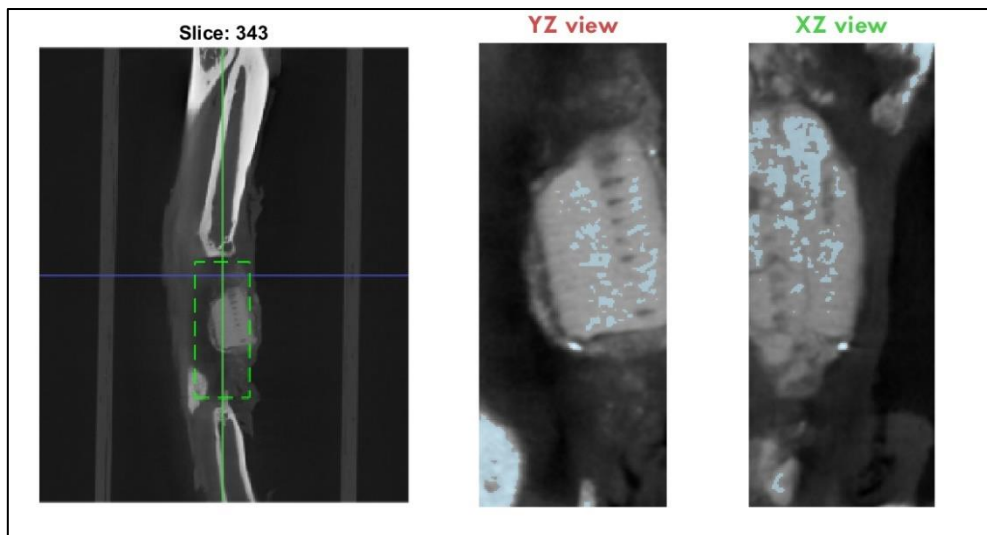
Estudio cortical



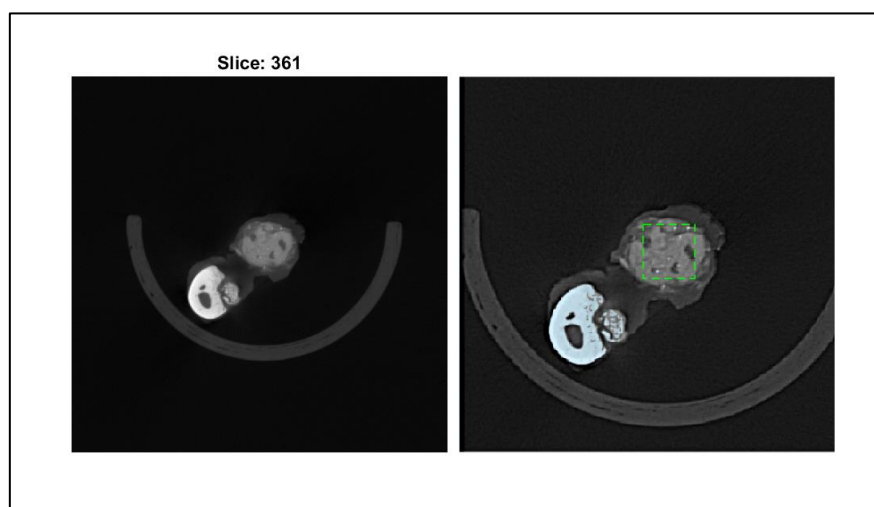
[illegible]

Control de 6 semanas

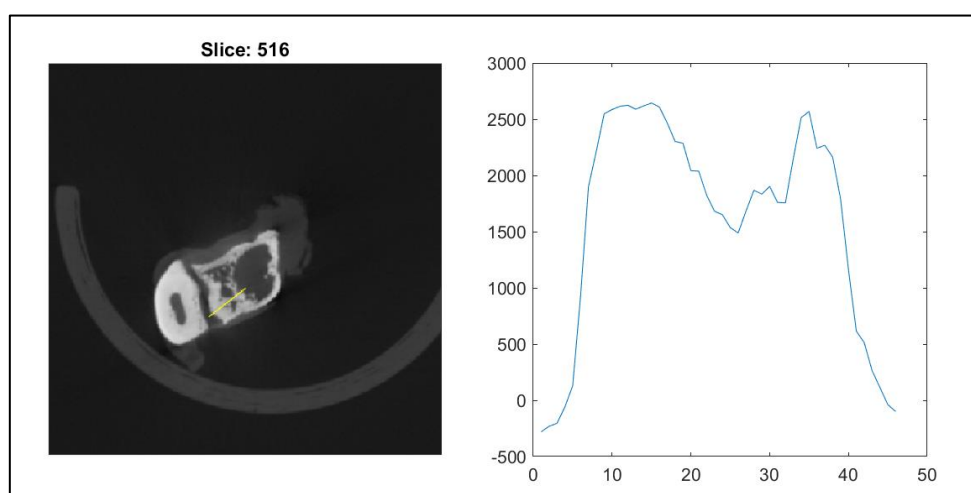
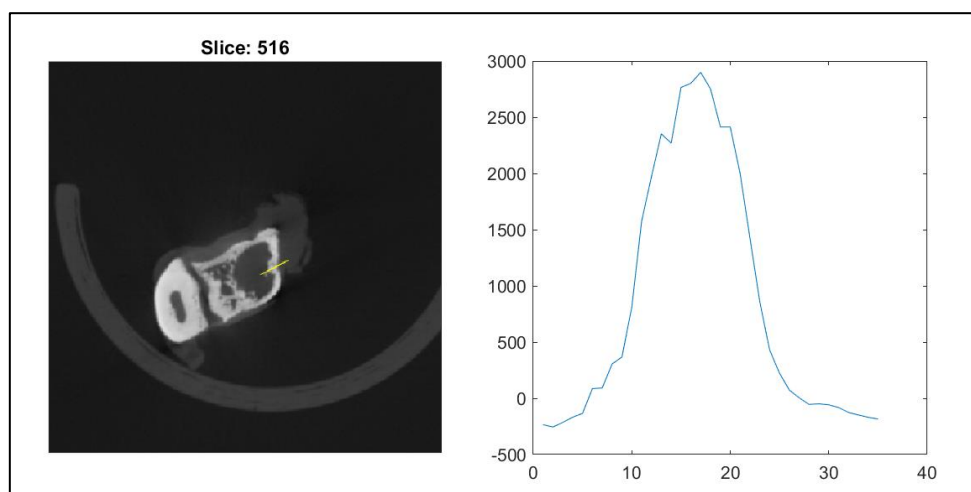
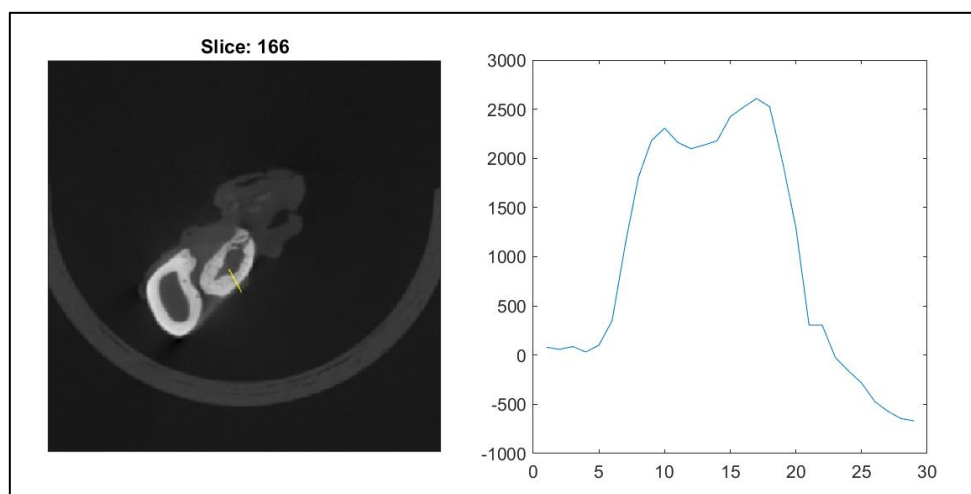
BV/TV

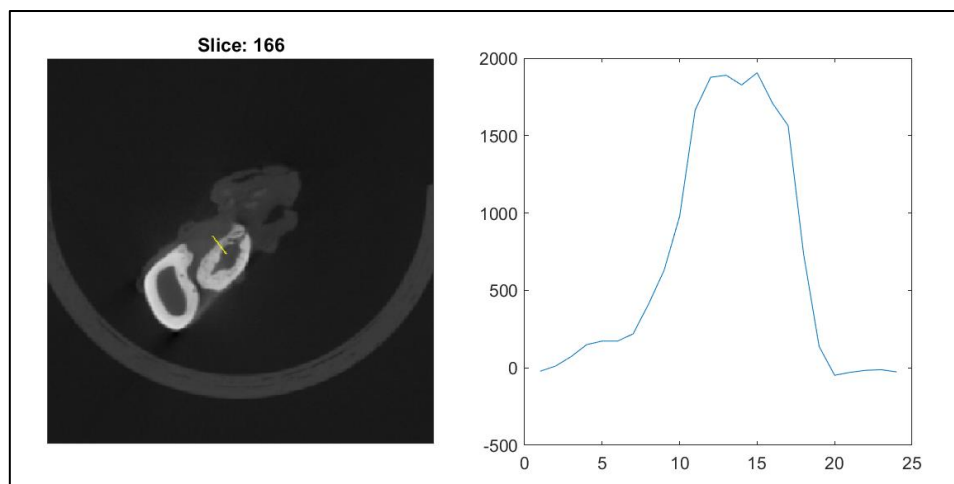


Estudio trabecular



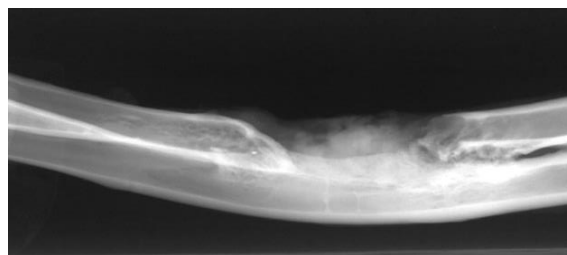
Estudio cortical



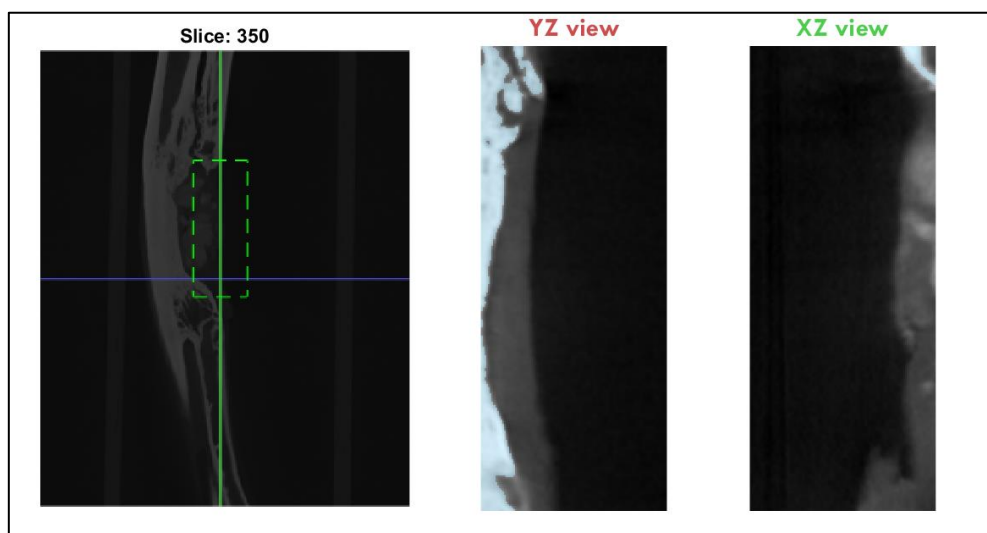


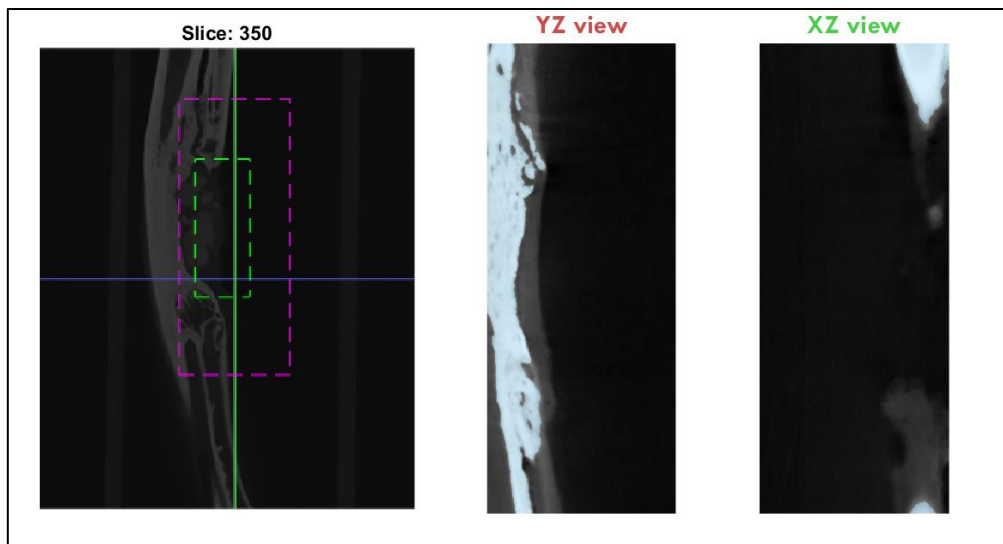
Pixel size (m		0,058													
id	Study name	ROI position	ROI size -X-Y	BV(px)	TV(px)	BV/TV	Threshold	Radio	ROI trabecul	ROI cortical	Tb.N	Tb.Th(mm)	Tb.Sep(mm)	Cortical.Th(n	
0	CT_119_id_0	361	106.6362	9	27	3599	0,00750208	155,568625	3	207.0172	165.8966	57	0,00167313	0,13617391	34,5293333
1	CT_119_id_1	516	97.82456	111.3333	466.6667	466.6667				287.5614	331.7719	414.0526	379.6667		2,0518822
2	CT_119_id_2	516	97.82456	111.3333	466.6667	466.6667				348.9649	382.1228	366.1579	348.9649		0,82085093
3	CT_119_id_3	166	124.8421	119.3158	466.6667	466.6667				340.3684	355.1053	369.2281	396.2456		0,83582701
4	CT_119_id_4	166	124.8421	119.3158	466.6667	466.6667				324.4035	341.5965	334.8421	356.9474		0,62002881
5	CT_119_id_5	343	295.4759	1	302001	2299960	0,13130707								
6	CT_119_id_6	343	243.7517	6	2774053	10102247	0,27459762								

Control de 12 semanas

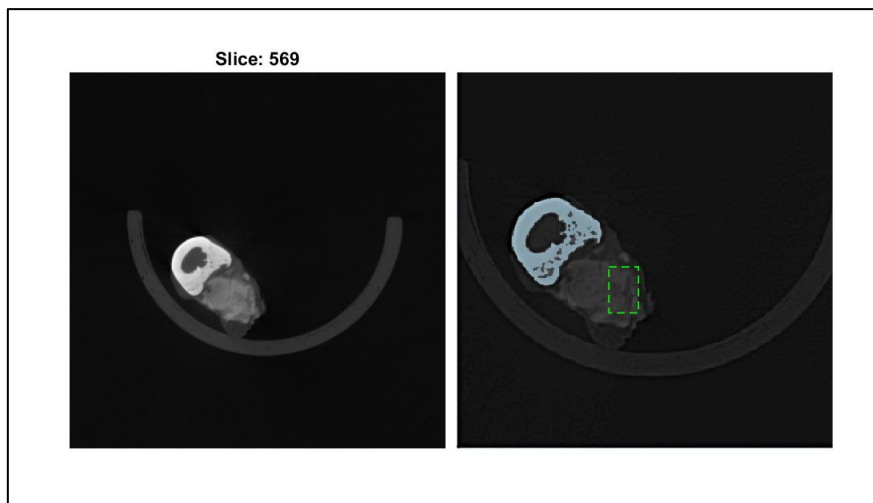


BV/TV

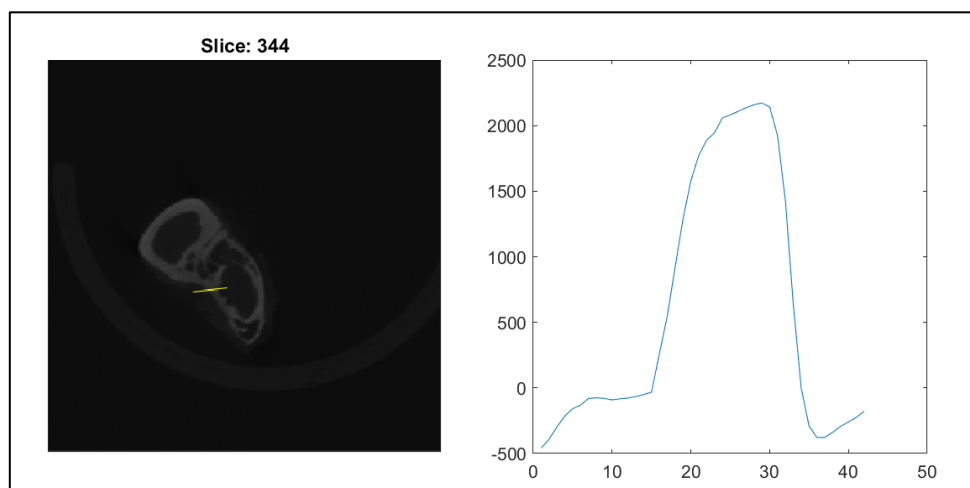


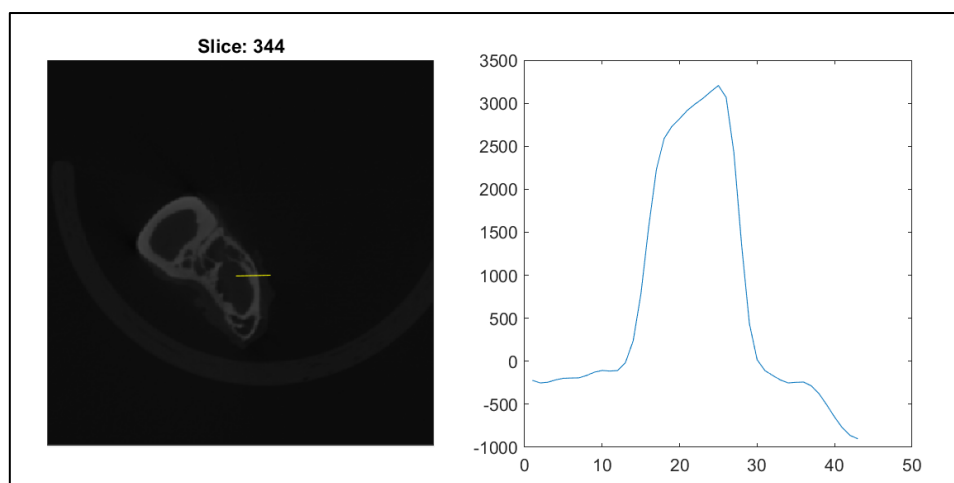
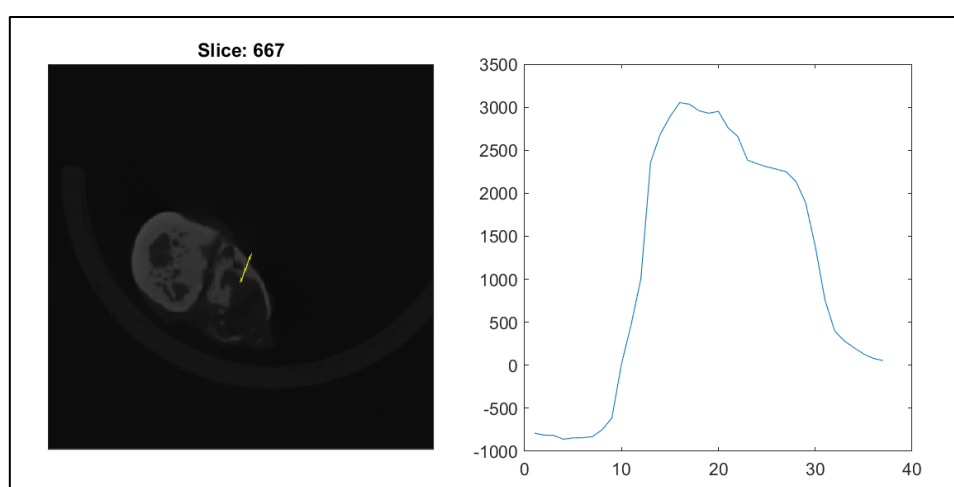
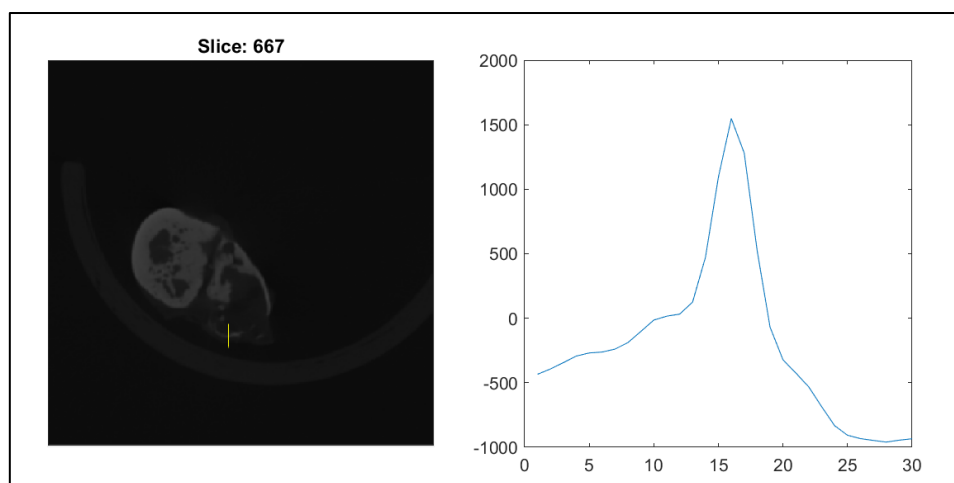


Estudio trabecular



Estudio cortical





Pixel size (m		0,058													
id	Study name	ROI position	ROI size -X Y	BV(px)	TV(px)	BV/TV	Threshold	Radio	ROI trabecul	ROI cortical	s Tb.N	Tb.Th(mm)	Tb.Sep(mm)	Cortical.Th(n	
0	CT_control_i	569	121.6006	1	0	1768	0	49,967553	3	170.5291	217.7754	33	0	0	0
1	CT_control_i	667	93.52632	133.4386	466.6667	466.6667					339.7544	326.2456	362.4737	398.0877	1,15766066
2	CT_control_i	667	93.52632	133.4386	466.6667	466.6667					311.5088	311.5088	453.3509	481.5965	0,28018605
3	CT_control_i	344	98.4386	135.2807	466.6667	466.6667					270.9825	311.5088	412.2105	407.2982	0,91258039
4	CT_control_i	344	98.4386	135.2807	466.6667	466.6667					326.2456	368.397	4737	396.2456	0,81173403
5	CT_control_i	350	289.8759	3	152704	846643	0,1803641								
6	CT_control_i	350	260.5517	2	1949330	5938437	0,32825641								